

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. September 2001 (13.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/66776 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/70,
15/74, 15/30, 15/31, 15/62, 1/20, C12P 21/00, 21/02,
C12R 1/125, 1/19, 1/37, C07K 14/31, 14/445, A61K
39/015, 39/085 // (C12P 21/00, C12R 1:125) (C12P 21/00,
C12R 1:19) (C12P 21/00, C12R 1:37) (C12P 21/02, C12R
1:125) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:37)

Anger 6, 07751 Isserstedt (DE). FAHNERT, Beatrix
[DE/DE]; Lasurstr. 15, 07551 Gera (DE). SIEBEN,
Stefan [DE/DE]; Pfälzer Str. 22, 06106 Halle/Saale (DE).
MÜLLER, Hans, Peter [DE/DE]; Glieshamm 4B, 27607
Langen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/02630

(74) Anwälte: MUTH, Heinz-Peter usw.; Uexküll & Stolberg,
Beselerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. März 2001 (08.03.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

- ohne internationale Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(30) Angaben zur Priorität:
100 11 617.5 10. März 2000 (10.03.2000) DE
100 11 358.3 12. März 2000 (12.03.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOISCHEN, Christian [DE/DE]; Berthold-Delbrück-Str. 58, 07749 Jena (DE). GUMPERT, Johannes [DE/DE]; Fritz-Ritter-Str. 20, 07747 Jena (DE). KUJAU, Joachim, Marian [DE/DE]; Anna Siemsen Str. 55, 07745 Jena (DE). FRITSCHE, Christine [DE/DE]; Dornburger Str. 130, 07743 Jena (DE). ELSKE, Gerda [DE/DE]; Überm



(54) Title: NOVEL L-FORM BACTERIAL STRAINS, METHOD FOR PRODUCING SAME AND THE USE THEREOF FOR PRODUCING GENE PRODUCTS

A2 (54) Bezeichnung: NEUARTIGE L-FORM-BAKTERIENSTÄMME, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG SOWIE DEREN VERWENDUNG ZUR HERSTELLUNG VON GENPRODUKTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining modified L-form bacterial strains. According to the inventive method, (a) an L-form bacterial strain that is adapted to a complex culture medium is alternately cultivated at different temperatures ranging from 20 to 40 °C and (b) is fermented when the hydromechanical stress of the cells increases. The invention also relates to modified L-form bacterial strains which can be obtained according to the inventive method and to the use thereof for producing gene products.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Gewinnung von modifizierten L-Form-Bakterienstämmen bei dem man (a) einen an ein komplexes Nährmedium adaptierten L-Form-Bakterienstamm alternierend bei unterschiedlichen Temperaturen im Temperaturbereich von 20 bis 40 °C kultiviert und (b) bei ansteigender hydromechanischer Belastung der Zellen fermentiert, modifizierte L-Form-Bakterienstämmen, die gemäß dem Verfahren erhältlich sind, und deren Verwendung zur Herstellung von Genprodukten.

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/66776

Neuartige L-Form-Bakterienstämme, Verfahren zu deren
Herstellung sowie deren Verwendung zur Herstellung
von Genprodukten

Die Erfindung betrifft zellwandlose bakterielle L-Form-Stämme, Verfahren zu deren Gewinnung und deren Verwendung zur Herstellung von Genprodukten.

Künstlich hergestellte Proteine sind Bestandteil von Arzneimitteln, Lebensmitteln, Waschmitteln und anderen für den täglichen Gebrauch wesentlichen Stoffen und Zusammensetzungen. Zur Herstellung solcher Proteine steht heutzutage eine Vielzahl von unterschiedlichen Verfahren zur Verfügung. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang die Herstellung von Proteinen in Zellkulturen. Die so hergestellten Proteine werden als rekombinant bezeichnet. Die Herstellung oder Expression rekombinanter Proteine ist in vielen verschiedenen Zellkultursystemen, auch Expressionssysteme genannt, im Stand der Technik bekannt. Je nach Typ der verwendeten Zelle unterscheidet man zwischen prokaryotischen Expressionssystemen, wenn Bakterien als Produzentenzellen verwendet werden, und eukaryotischen Expressionssystemen, wenn

- 2 -

eukaryotische Zellen von Hefen, Pilzen, Pflanzen oder Tieren als Produzentenzellen verwendet werden.

Trotz der Vielzahl der bekannten und verwendeten Systeme lassen sich zahlreiche Proteine, insbesondere Membranproteine, bisher nicht oder nur mit einer unbefriedigenden Ausbeute und Reinheit herstellen. Bei der Verwendung von eukaryotischen Expressionssystemen liegen die Ursachen dafür vor allem im proteolytischen Abbau der hergestellten Proteine durch zelleigene Proteasen, in der häufig auftretenden Toxizität der fremden Proteine für die Erzeugerzellen sowie, im Falle von Membranproteinen, in der starken Assoziation der hergestellten Proteine mit den Zellmembranen der Produzentenzellen. Hinzu kommt, daß Membranproteine nur in geringen Mengen in den Membranen vorkommen und daß das Membranmaterial nur in begrenzten Mengen verfügbar ist (z.B. bei Säugerzellen). Die Isolierung der Membranen erfordert zudem meist material- und zeitaufwendige Abtrennverfahren, um störende Strukturen wie Zellwand, Geißeln, Fimbrien und andere Membran- und Zellorganellen zu entfernen.

Die Produktion rekombinanter Proteine in prokaryotischen Expressionssystemen hat den Nachteil, daß sich die Proteine häufig zu funktionell inaktiven Aggregaten im Zytosol oder Periplasma, sogenannten "inclusion bodies", zusammenlagern. Ferner weisen auch prokaryotische Produzentenzellen zelleigene Proteasen auf, welche die hergestellten, fremden Proteine abbauen können. Außerdem erschweren bei der Verwendung von *E. coli* als Produzentenzellen häufig toxische Zellbestandteile, insbesondere Bestandteile der Zellwände, die Gewinnung von für den Verbraucher unschädlichen Proteinpräparaten.

Um die mit der Produktion von rekombinanten Proteinen in prokaryotischen Zellen einhergehenden Nachteile zu überwinden, wurde im Stand der Technik die Verwendung sogenannter L-Form-Bakterienzellen vorgeschlagen. L-Form-Stämme sind Bakterien, welche mit einer stark veränderten oder ohne Zellwand wachsen.

- 3 -

Nach der Beschaffenheit der Zellumhüllung und ihrer Stabilität lassen sich L-Form-Bakterienstämme in vier Gruppen unterteilen. Sphäroplasten-Typ L-Formen besitzen noch Reste der Zellwand, z.B. der äußeren Membran, während Protoplasten-Typ L-Form-Zellen lediglich von der Zytosplasmamembran umgeben sind. Zellen, welche nur unter ständigem Selektionsdruck mit Hilfe von Inhibitoren der Zellwandbiosynthese (beispielsweise Ampicillin) in der L-Form-Phase verbleiben, werden instabile L-Formen genannt. Als stabile L-Formen werden dagegen die Stämme bezeichnet, deren Zellen die Fähigkeit zur Ausbildung einer Zellwand vollständig verloren haben.

Die Umwandlung von gewöhnlichen Bakterienzellen, sogenannten Elternbakterien, in L-Form-Zellen ist an sich bekannt (J. Gumpert und U. Taubeneck, 1983, Experientia Suppl. Vol. 46 227-241; L.H. Mattmann, 1993, Cell Wall Deficient Forms, CRC Press, Boca Raton).

Hierbei werden Zellen einer Bakterienart zunächst durch Behandlung mit Substanzen, welche die Zellwandbiosynthese hemmen (z.B. β -Lactam-Antibiotika, Vancomycin, D-Cycloserin) oder welche die Zellwand abbauen (z.B. lytische Enzyme wie Lysozym) in Sphäroplasten oder Protoplasten umgewandelt. Diese zellwanddefekten Zellen werden auf einem geeigneten Medium bis zur Bildung typischer L-Form-Kolonien vermehrt und solange auf L-Form-Medium übertragen, bis ein Wachstum als dichter Kolonierasen erreicht ist.

Als Nährmedium dient eine Lösung, die eine komplexe Nährkomponente, vorzugsweise frisch hergestellten Fleischextrakt, zur Grundversorgung mit C- und N-Quellen, Aminosäuren und Ionen, einen Wachstumsstimulator, vorzugsweise Hefeextrakt mit essentiellen Vitaminen und Aminosäuren, einen osmotischen Stabilisator zur Vermeidung von Zellyse, vorzugsweise Saccharose oder NaCl, einen Membranstabilisator, vorzugsweise Serum und zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} , und einen Zellwandbiosynthese-Inhibitor,

- 4 -

vorzugsweise β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin, enthält (primäres L-Form-Medium).

Ein häufig verwendetes komplexes Medium ist L-Form-Standard-Medium (LFS). LFS-Medium enthält frischen Fleischextrakt mit Zusätzen von Hefeextrakt (0,5-1 % w/v), Pferdeserum (8-10 % v/v), Saccharose (6-10 % w/v), Penicillin (200-1000 U/ml), Bacto-Agar (1-1,5 % w/v).

Die Abkürzung w/v steht für Masse pro Volumen, d.h. 10 % w/v entsprechen 10 g pro 100 ml. Falls nicht anders angegeben sind alle Prozentangaben in der vorliegenden Beschreibung w/v-Angaben. Die Abkürzung v/v steht für Volumen pro Volumen.

Der Fleischextrakt wird erhalten, indem man 2 kg Rindfleisch mit 4 l Wasser für 1 Stunde im Dampftopf extrahiert, man das Filtrat dann mit 0,3 bis 1 % Bacto Pepton und 0,5 bis 2 % NaCl versetzt und auf pH 7,0 eingestellt.

Anschließend selektiert man stabile L-Formen, d.h. solche L-Formen, welche die Fähigkeit zur Reversion, d.h. zur Resynthese der Zellwand in Abwesenheit von Penicillin verloren haben. Dazu werden Agarblöckchen mit L-Form-Kolonien einer Kultur so lange parallel auf LFS-Agarmedium mit und ohne Penicillinzusatz übertragen, bis auf den penicillinfreien Platten nur noch L-Form-Kolonien wachsen und keine Reversion mehr erfolgt. Diese stabilen L-Form-Kolonien werden vermehrt, bis ein dichter Kolonierasen auf den penicillinfreien LSF-Agarplatten erreicht ist.

Die Herstellung stabiler L-Formen von *E. coli* wird beispielsweise von U. Taubeneck und E. Schumann in Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie, Band 6, 1966, Seiten 341-343, und von *P. mirabilis* von U. Taubeneck in Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie, Band 2, 1962, Seiten 132-156 beschrieben.

- 5 -

Die stabilen L-Formen werden anschließend an ein Wachstum in flüssigem LFS-Medium adaptiert. Dieses enthält frisch hergestellten Fleischextrakt, (2-5 %), Bacto-Pepton (0,5-1 %), NaCl (0,5-2 % w/v), Hefeextrakt (0,5-1 % v/v), Pferdeserum (8-10 % v/v) und Saccharose (6-10 %). Hierzu werden Agarblöcke (2 x 2 cm) mit reichlich Kolonierasen in 10-40 ml flüssiges LFS-Medium gegeben und bei 37 °C unter Schütteln bebrütet. Eine Optimierung des Wachstums in flüssigem LFS-Medium wird durch fortlaufende Übertragung der Kulturen (alle 2-5 Tage) in frisches Medium, bis die L-Form-Zellen im Verlauf von 24 Stunden zu Zelldichten von 10^8 Zellen/ml wachsen, erreicht. Durch fortlaufende Übertragung und Wachstum in frischem LFS-Medium mit stufenweise reduzierten Mengen an Serum und Saccharose werden im Verlauf von 50 - 80 Passagen L-Form-Stämme, z.B. von *P. mirabilis* und *E. coli*, selektiert, die auch ohne Zusätze von Serum und Saccharose gutes Wachstum zeigen. Diese können dann durch schrittweisen Ersatz des Fleischextrakt-Anteils des LFS-Mediums durch andere in ihrer Zusammensetzung definierte Nährkomponenten an ein Wachstum in fleischextraktfreien Nährmedien adaptiert werden.

Besonders geeignete definierte komplexe Nährkomponenten zum Ersatz des Fleischextrakts sind Brain-heart-infusion-(BHI)-broth (BHIB), Tryptic-soy-broth (TSOYB), Todd-Hewitt-broth (THEB) und L-broth (LB). Die detaillierte Zusammensetzung dieser Nährkomponenten ist in den Firmenhandbüchern Merck-Nährboden Handbuch, E. Merck, Darmstadt, 1992 und Difco-Manual 10th. Edition 1984, Difco Laboratoris Detroit MI USA beschrieben.

Die bekannten L-Form-Stämme zeigen in diesen Medien aus unerklärlichen Gründen oft unbefriedigendes Wachstum.

Gumpert et al. offenbaren stabile L-Form-Zellen, die auf die Behandlung normaler Bakterienzellen mit Zellwandbiosyntheshemmern wie beispielsweise Ampicillin und gleichzeitige osmotische Stabilisierung zurück gehen. Diese Zellen bilden keine Zellwand und kein periplasmatisches Kompartiment mehr aus und weisen

- 6 -

keinerlei extrazellulär detektierbare Proteasen auf (J. Gumpert, E. Schuhmann, U. Taubeneck 1971, Zeitschrift Allg. Mikrobiologie, 11, 19-33; J. Gumpert, U. Taubeneck 1983, Experientia Suppl. Vol. 46, 227-241).

L-Form-Bakterienstämme sind aus vielerlei Gründen prinzipiell für die Herstellung rekombinanter Proteine geeignet. Beispielsweise ist ihre Membran, die für die Herstellung von Membranproteinen ein adäquates Milieu darstellt, von außen frei zugänglich (K. Gura, J. Gumpert, C. Hoischen, 1997, IMB Anual Report 1996, 101-104; C. Hoischen, K. Gura, C. Luge, J. Gumpert 1997, Journal Bacteriol. 179, 3430-3436). Ferner weisen Protoplasten-Typ L-Form-Stämme außer der zytoplasmatischen Membran keinerlei Zellorganellen auf, von denen das hergestellte Protein abgetrennt werden muß.

Die DD 269 166 A1 beschreibt die Verwendung zellwandloser Gram-negativer Bakterien, wie *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Proteus* und *Escherichia*, sowie Gram-positiver Bakterien, wie *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces* und *Thermoactinomyces*, zur Gewinnung rekombinanter Genprodukte, wie Streptokinase, Human-Interferon-alpha-1 oder Prochymosin.

Die DD 280 333 A1 offenbart ein Verfahren zur Gewinnung milch-fällender Enzyme unter Verwendung von stabilen L-Form-Stämmen bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs.

Die DD 281 816 A5 betrifft die Herstellung von Serotyp C-Streptokinase unter Verwendung von L-Form-Stämmen von z.B. *P. mirabilis* und *Bac. subtilis*.

Bisher wurde die Gewinnung von mehr als 20 verschiedenen Proteinen unter Verwendung von L-Form-Expressions-Systemen beschrieben. Die Herstellung der Proteine mit L-Form-Zellen erfolgte zum Teil unter halb-technischen Bedingungen in 2 bis

- 7 -

100 l Fermentern (J. Gumpert und C. Hoischen 1998, Current Opinion in Biotechnology, 9, 506-509).

Gumpert und Taubeneck offenbaren L-Form-Stämme, die in der Lage sind, in Kulturmedien ohne Zusatz von Serum oder osmotischen Stabilisatoren zu wachsen (J. Gumpert und U. Taubeneck 1983, Experientia Suppl. Vol. 46 (1983) 227-241).

Die bekannten L-Form-Zellen sind aufgrund ihrer fehlenden Zellwand empfindlich, beispielsweise gegenüber Umgebungseinflüssen und chemischen und physikalischen Veränderungen des Wachstumsmediums. Sie eignen sich daher eher für die Produktion von Proteinen in kleinen Mengen, weniger für Fermentationen in technischem Maßstab (J. Gumpert und C. Hoischen 1998, Current Opinion in Biotechnology, 9, 506-509).

Die Herstellung rekombinanter Genprodukte in membrangebundener Form, wobei die funktionell aktiven Moleküle auf der Außenseite der Zelloberfläche frei zugänglich sind (Surface-Display), ist sowohl für die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen, für Interaktionsstudien als auch für diagnostische und immuno-protektive Anwendungen von großer Bedeutung. Hierbei werden antigene Determinanten, single chain Antikörperfragmente, heterologe Enzyme, Polyhistidyl-Tags und Peptidbibliotheken auf der bakteriellen Oberfläche exprimiert (Ståhl, S. und Uhlén, M., TIBTECH 1997, 15, 185-192). Bei den bisher üblichen bakteriellen Zelltypen, die für das Surface-Display eingesetzt werden, handelt es sich um Gram-negative *E. coli* Stämme und Gram-positive Stämme, wie z.B. *Bac. subtilis* und *Staphylococcus* Arten.

Beim Surface-Display mit Gram-negativen Stämmen wird das präsentierte Protein in der Regel mit Proteinkomponenten der äußeren Membran, wie OmpA, LamB und PhoE, Flagellenproteinen (Flagellin) oder Proteinen der Fimbrien (FimA, FimH), fusioniert und dadurch in der äußeren Membran verankert. Die Nachteile dieses Systems liegen darin, daß (i) die präsentierten Proteine

- 8 -

durch innere Membran, Periplasma und Zellwand (Mureinsacculus und äußere Membran) transportiert werden müssen, (ii) daß die Größe der präsentierten Proteine limitiert ist und (iii) daß durch zahlreiche immunreaktive Komponenten der Zelloberfläche eine Reihe medizinischer Anwendungen ausgeschlossen bleiben.

In Gram-positiven Bakterien wird das präsentierte Protein meist mit einem Oberflächenprotein der Zellwand (z.B. Protein A, M6 Protein) fusioniert und hierdurch in der Zellwand fixiert. Nachteilig auf das Surface-Display mit Gram-positiven Bakterien wirken sich das Vorhandensein zelleigener Antigendeterminanten und das häufige Auftreten extrazellulärer Proteasen auf. Das präsentierte Protein muß ebenfalls erst durch die zytoplasmatische Membran und die Zellwand transportiert werden.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue L-Form-Stämme für die biotechnologische Gewinnung von Genprodukten bereitzustellen, die eine erhöhte Stabilität gegenüber chemischen, physikalischen und mechanischen Belastungen aufweisen und die sich daher besonders für Fermentationen unter technischen Bedingungen und insbesondere zur Herstellung membranständiger Proteine eignen.

Diese Aufgabe wurde überraschenderweise durch ein Verfahren zur Gewinnung von modifizierten L-Form-Bakterienstämmen gelöst, bei dem man

- a) einen an ein komplexes Nährmedium adaptierten L-Form-Bakterienstamm alternierend bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 20 bis 40 °C kultiviert, und
- b) die Zellen unter zunehmenden hydromechanischen Belastung fermentiert.

Als Ausgangsstamm für Schritt (a) eignen sich grundsätzlich alle L-Form-Stämme, insbesondere L-Form-Stämme, die mit Wachstumsraten $\mu > 0,1 \text{ h}^{-1}$ zu Zellkonzentrationen von 10^8 Zellen/ml wachsen.

- 9 -

Erfindungsgemäß werden vorzugsweise stabile L-Formen von Bakterien verwendet, insbesondere stabile Protoplasten-Typ L-Formen.

Es können sowohl in fleischextrakthaltigen Komplexmedien, vorzugweise LFS-Medium, als auch in fleischextraktfreien Komplexmedien, vorzugweise solchen, die auf den oben genannten definierten komplexen Nährkomponenten basieren, besonders bevorzugt BHIB, stabil wachsende Stämme eingesetzt werden. Fleischextraktfreie Medien sind bevorzugt, da diese reproduzierbarer und kostengünstiger in Herstellung und bei der Gewinnung medizinischer Produkte unbedenklicher sind.

Als Ausgangsstämme geeignete L-Formen werden beispielsweise von J. Gumpert und U. Taubeneck 1983, Experientia Suppl. Vol. 46, 227-241, in der dort zitierten Literatur und in DD 269 166 A1 beschrieben. Bevorzugte Ausgangsstämme sind die dort genannten L-Form-Stämme von *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* und *Bacillus subtilis*. Weitere bevorzugte L-Form-Stämme sind solche von *Bacillus licheniformis*, *Nocardia asteroides*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces hygroscopicus* und *Thermoactinomyces vulgaris*. Besonders bevorzugte Ausgangsstämme sind die L-Formen von *P. mirabilis* LVI, *P. mirabilis* L99, *E. coli* LWF+, *E. coli* LWF- und *Bac. subtilis* L170.

Die als Ausgangsstämme des erfundungsgemäßen Verfahrens bevorzugten L-Form-Stämme von *P. mirabilis* LVI, *P. mirabilis* L99, *E. coli* LWF+, *E. coli* LWF- und *Bac. subtilis* L170 sind in der DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Marscheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig) hinterlegt. Die Hinterlegungsnummern lauten: DSM 7988 (*Proteus mirabilis* LVI), DSM 7990 (*Proteus mirabilis* L99), DSM 7989 (*Escherichia coli* LWF+), DSM 8012 (*Escherichia coli* LWF-) und DSM 7978 (*Bacillus subtilis* L170).

- 10 -

Es wurde gefunden, daß sich L-Form-Bakterienstämme, die gemäß den obigen Verfahrensschritten (a) oder (b), vorzugsweise (a) und (b) behandelt wurden, neben einem stabilen Wachstumsverhalten insbesondere durch eine hohe mechanische Belastbarkeit und eine hohe Temperaturtoleranz auszeichnen. Sie sind gegenüber Schwankungen der Wachstumstemperatur, der Mediumzusammensetzung, des pH-Werts und anderer Fermentationsparameter deutlich widerstandsfähiger und eignen sich daher besonders zur Produktion rekombinanter Genprodukte unter technischen Bedingungen.

Die Schritte (a) und (b) können gleichzeitig oder nacheinander durchgeführt werden. Bevorzugt ist die Reihenfolge Schritt (a) gefolgt von Schritt (b). Der Schritt (a), der Schritt (b) oder vorzugsweise beide Schritte können ein- oder mehrfach wiederholt werden.

Der Schritt (a) umfaßt ein mehrstufiges Wachstumsregime mit alternierenden Wachstumstemperaturen. Vorzugsweise wird Schritt (a) in der Weise durchführt, daß man die Temperatur alternierend zwischen zwei Temperaturen T₁ und T₂ variiert, wobei T₁ im Verlauf des Schrittes (a) gleich bleibt und T₂ variiert wird. Hierbei liegen die Werte für T₂ vorzugsweise unter dem Wert für T₁. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird T₂ stufenweise abgesenkt und nach dem Erreichen der angestrebten minimalen Temperatur auf einen Wert oberhalb von T₁ erhöht.

In Schritt (a) wird zunächst die betreffende Kultur in frisches Medium überimpft und im Schüttelinkubator bei einer konstanten Temperatur (T₁) über 24 bis 36 Stunden als submerse Schüttelkultur bebrütet (Stufe 1). Die Kultivierung erfolgt beispielsweise in 100 ml Gefäßen, vorzugsweise in 35 ml 3%igem BHI-Medium mit Zusatz von 0,5 % Hefeextrakt. Die Kultivierung wird fortgesetzt bis eine Zellkonzentration von 10⁹ Zellen/ml erreicht ist.

Anschließend wird ein Teil der Kultur aus Stufe 1 in frisches Medium übertragen (Inokulum etwa 10 % v/v) und bei einer Tempera-

- 11 -

tur (T2), die vorzugsweise niedriger als die Temperatur T1 ist, über einen Zeitraum von vorzugsweise 18 bis 48 Stunden, besonders bevorzugt 24 bis 36 Stunden bebrütet (Stufe 2). Im Anschluß an Stufe 2 wird die Kultur wieder in frisches Medium übertragen und bei der Temperatur T1 kultiviert (Stufe 3). T1 ist vorzugsweise die für den Ausgangsstamm optimale Wachstumstemperatur, also beispielsweise 37 °C, und wird im Verlauf des Schrittes (a) nicht verändert, während T2 stufenweise abgesenkt wird, vorzugsweise bis auf einen Wert von 20 bis 22 °C besonders bevorzugt etwa 20 °C. T2 wird vorzugsweise in 5 bis 10 Etappen, vorzugsweise etwa 7 Etappen auf die gewünschte Zieltemperatur abgesenkt, so daß Schritt (a) vorzugsweise insgesamt 10 bis 20 und besonders bevorzugt etwa 14 Stufen umfaßt. In jeder Stufe werden die Zellen vorzugsweise für 18 bis 48 Stunden, besonders bevorzugt 24 bis 36 Stunden bei der jeweiligen Temperatur kultiviert. Vorzugsweise wird die Kultivierung jeweils solange fortgesetzt bis eine Zellkonzentration von 10^9 Zellen/ml erreicht ist.

Die Temperatur T2 wird pro Etappe vorzugsweise um 2 bis 5 °C gesenkt, wobei die Temperaturänderung von Etappe zu Etappe auch unterschiedlich ausfallen kann. Die Verwendung von mehr als zwei unterschiedlichen Temperaturen, also beispielsweise 3 oder 4 Temperaturen ist möglich. Nach dem Erreichen der angestrebten Minimaltemperatur kann T2 gemäß einer bevorzugten Ausführungsform auf einen Wert oberhalb von T1, vorzugsweise 2 bis 5°C oberhalb der optimalen Wachstumstemperatur, beispielsweise also 40°C angehoben werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Kultur alle 24 Stunden in frisches Medium gleicher Zusammensetzung übertragen wobei die Wachstumstemperatur alternierend gemäß folgendem Schema variiert wird: Start: T1 = 37°C → T2 = 32°C → T1 = 37°C → T2 = 30°C → T1 = 37°C → T2 = 28°C → T1 = 37°C → T2 = 26°C → T1 = 37°C → T2 = 24°C → T1 = 37°C → T2 = 22°C → T1 = 37°C → T2 = 20°C → T1 = 37°C → T2 = 40°C → T2 = 20°C Ende.

- 12 -

Als Ergebnis werden Stämme erhalten, die gegenüber den Ausgangsstämmen reproduzierbarer im Wachstumsverlauf, toleranter gegenüber Wachstumstemperaturen und konstanter in der Wachstumsrate sind.

Im Verfahrensschritt (b) werden die L-Form-Zellen alternierend zunehmenden hydromechanischen Belastungen ausgesetzt. Dazu werden die in Schritt (a) erhaltenen L-Form-Kulturen als Ausgangsstamm bei variierenden Scherkräften und vorzugsweise auch bei variierenden Belüftungsraten fermentiert. Variierende Scherkräfte lassen sich beispielsweise durch das Variieren der Rührerdrehzahl erzeugen, mit der das Fermentationsmedium gerührt wird.

Schritt (b) wird vorzugsweise in einem Fermenter mit einem Nettovolumen von 2 l, einer Höhe von 35 cm und einem Durchmesser von 18 cm durchgeführt, der mit einem Wellendiskusrührer mit einem Durchmesser von 7 cm ausgestattet ist.

Das Fermentationsregime wird beispielsweise so gestaltet, daß nacheinander mehrere Fermenterläufe durchgeführt werden, wobei die Zellen eines Fermenterlaufes als Inokulum für den nächsten Fermentationslauf eingesetzt werden.

Vorzugsweise werden 1000 bis 2000 ml BHIB Medium mit 0,7 % Hefeextrakt und 1 % Saccharose mit 10 % (V/V) der Kultur aus Schritt (a) bzw. der vorherigen Fermenterkultur beimpft und bei konstanter Rührgeschwindigkeit (Festdrehzahl VF) und Belüftungsrate bei vorzugsweise 32 °C bis 37 °C fermentiert. Die Fermentation wird bis zu einer Zellkonzentration von 10^8 bis 10^9 Zellen/ml fortgesetzt (etwa 24 bis 48 Stunden). Unter diesen Bedingungen ist der Sauerstoffverbrauch der L-Form-Zellen stark erhöht. Ein Absinken des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 auf Werte unter etwa 5 % sollte vermieden werden. Hierzu wird bei Erreichen eines Sauerstoffpartialdrucks von etwa 5 % die Rührgeschwindigkeit kurzfristig auf einen festgelegten Wert (Umschaltdrehzahl VU) erhöht und bei Erreichen eines Partialdrucks von 20 bis 30

- 13 -

% auf die Festdrehzahl VF zurückgesetzt. Die Prozentangabe bezieht sich auf die Sättigungskonzentration von Sauerstoff in dem betreffenden Kulturmedium. Im Verlauf des Schrittes (b) werden die Festdrehzahl VF und die Umschaltdrehzahl VU des Rührers in den aufeinanderfolgenden Fermenterläufen verändert. Vorzugsweise umfaßt Schritt (b) 5 bis 10, besonders bevorzugt etwa 7 Fermenterläufe.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Rührgeschwindigkeiten in Schritt (b) entsprechend dem folgenden Schema verändert:

1. Lauf: VF = 200 U/min -- VU = 500 U/min;
2. Lauf: VF = 250 U/min -- VU = 500 U/min;
3. Lauf: VF = 300 U/min -- VU = 600 U/min;
4. Lauf: VF = 350 U/min -- VU = 600 U/min;
5. Lauf: VF = 400 U/min -- VU = 700 U/min;
6. Lauf: VF = 450 U/min -- VU = 700 U/min;
7. Lauf: VF = 500 U/min -- VU = 800 U/min.

Die Belüftungsrate wird vorzugsweise auf 0,2 bis 1,0, besonders bevorzugt 0,6 bis 1,0 Volumeneinheiten Luft pro Volumeneinheit Medium pro Minute (l/l min), ganz besonders bevorzugt etwa 0,7 l/l min eingestellt.

Die genaue Zusammensetzung der in den Verfahrensschritten (a) und (b) einzusetzenden Nährmedien wird entsprechend den Stoffwechseltypen und physiologischen Eigenheiten der Elternbakterien ausgewählt. Für die jeweiligen Ausgangsstämme geeignete Medien sind bekannt, siehe z.B. J. Gumpert 1982, Ztschr. Allg. Mikrobiol., 22, 617-627. Vorzugsweise werden in den Schritten (a) und (b) Brain-heart-infusion-broth (BHIB), Todd-Hewitt-broth (THEB), Tryptic-Soy-broth (TSOYB) oder L-broth (LB) als Medium verwendet. Für die erfindungsgemäß bevorzugten Ausgangsstämme eignet sich besonders ein Medium folgender Zusammensetzung: BHIB (Fa. Difco) 3 g, Hefeextrakt (Fa. Difco) 0,5 g, Saccharose 1 g, destilliertes

- 14 -

Wasser 100 ml. Ausgehend von den bekannten Medien kann die optimale Mediumzusammensetzung für Stämme wie beispielsweise *Streptokokken* und *Streptomyceten* durch routinemäßige Versuchsreihen ermittelt werden.

Bei der Verwendung der bevorzugten L-Form Ausgangsstämme werden als Verfahrensprodukte die modifizierten Stämme *P. mirabilis* LVIWEI, *P. mirabilis* L99WEI, *E. coli* LWF+WEI, *E. coli* LWF-WEI und *B. subtilis* L170WEI erhalten. Diese wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig unter den Hinterlegungsnummern DSM 13363 (*P. mirabilis* LVIWEI), DSM 13364 (*P. mirabilis* L99WEI), DSM 13362 (*E. coli* LWF+WEI) und DSM 13361 (*B. subtilis* L170WEI) hinterlegt.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen L-Form-Stämme weisen im Vergleich zu den Ausgangsstämmen neben den bereits genannten folgende Vorteile auf: unmittelbare Einsetzbarkeit in Fermentationen, homogenere Zellpopulationen mit geringeren Anteilen an lysierenden Zellen, stabilerer Stoffwechsel, höhere Zellzahlen, höhere Biomassekonzentrationen, höhere Verdopplungsraten in der exponentiellen Wachstumsphase, günstigere pH-Profile, bessere Verträglichkeit von Antischäummitteln, bessere Tolerierung von höheren Rührgeschwindigkeiten. Die Zellen können im Temperaturbereich von 20 bis 40°C unmittelbar bei der für die Gewinnung des gewünschten Genprodukts geeigneten Temperatur fermentiert werden.

Ein weiterer Vorteil der modifizierten L-Form-Stämme ist darin zu sehen, daß sie in verfahrenstechnisch relevanten Nährmedien wie BHIB, THEB, TSOYB, ggf. mit Zusatz von Hefeextrakt (0,5-1%) ein verbessertes Wachstum zeigen.

Für *P. mirabilis* LVI WEI wurden im Vergleich zum Ausgangsstamm beispielsweise folgende Werte erzielt:

- 15 -

<u>Parameter</u>	<u>Ausgangsstamm</u>	<u>modifizierter Stamm</u>
maximale Zellzahl	1×10^8	8×10^{10} Zellen/ml
maximale Verdopplungszeit	0,8-1,2	0,5 bis 0,7 Stunden
maximal erzielbare Biomassekonzentration	3-4	5 bis 8 g/l
maximal tolerierte Rührgeschwindigkeit	500-600	600 - 800 U/min
Temperaturbereich für stabiles Wachstum	28-38	20 - 40 °C

Ähnliche Verbesserungen wurden für die übrigen L-Formstämme gefunden.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen L-Form-Stämme eignen sich daher insbesondere für Fermentationen in Rühr- und Airlift-Fermentern von 2 - 300 l und sind aufgrund ihrer guten Suspendierbarkeit, ihres Tolerierungsvermögens von Antischaummitteln und hydromechanischen Stressfaktoren verfahrenstechnisch vorteilhaft handhabbar.

Im Vergleich zu den zytoplasmatischen Membranen der Ausgangs-L-Form-Stämme zeigen die zytoplasmatischen Membranen der erfindungsgemäß gewonnenen L-Form-Stämme charakteristische Unterschiede im Proteinmuster. Sie sind beispielhaft für *E. coli* LWF+ und *E. coli* LWF+WEI in den Ausführungsbeispielen beschrieben und weisen auf genotypische und phänotypische Veränderungen hin.

Weitere genotypische Veränderungen in den neuen Stämmen manifestieren sich in Unterschieden in den Bandenmustern der chromosomal DNA nach Verdau mit Restriktasen und Auftrennung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese. Sie sind für *E. coli* LWF+ und *E. coli* LWF+WEI ebenfalls in den Ausführungsbeispielen dokumentiert.

- 16 -

Die L-Form-Stämme beispielsweise von *E. coli*, *P. mirabilis* und *B. subtilis* besitzen keine extrazellulären bzw. periplasmatischen Proteaseaktivitäten, und damit ist die Gefahr von proteolytischen Abbauprozessen an rekombinanten Proteinen wesentlich verringert.

Darüber hinaus lassen sich die erfindungsgemäß modifizierten Stämme, z. B. durch die Zugabe von 0,1-1 μ g/ml lyso-Lecithin zum Kulturmedium, zur Bildung von extrazellulären Membranvesikeln anregen. Diese Eigenschaft ist für die Synthese rekombinanter Membranproteine vorteilhaft.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß mit den für *E. coli* (Elternform) optimierten Genkonstrukten (Promotoren, Kontrollsequenzen, Originregionen, Signalsequenzen) eine gut kontrollierbare Genexpression und Produktsynthese möglich ist, so daß auf ein großes Repertoire bekannter Mittel zur genetischen Transformation und Überexpression heterologer Genprodukte zurückgegriffen werden kann. Diese Genkonstrukte können sowohl für modifizierte L-Formen von *E. coli* als auch für andere Stämme wie beispielsweise *P. mirabilis* und *Bac. subtilis* eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß gewonnenen L-Form-Stämme weisen zudem eine einheitlichere Zellmorphologie, einen stabilen Zellstoffwechsel und stabile, reproduzierbare Wachstumseigenschaften auf. Sie lassen sich durch Fermentation in 1 bis 300 l Fermentern kostengünstig in großen Mengen bereitstellen.

Alternativ können an technische Wachstumsbedingungen angepaßte neue L-Form-Stämme durch gezielte genetische Manipulation der Ausgangs-L-Form-Stämme hergestellt werden. Beispielsweise lassen sich durch Mutationen in den Genen *recA*, *hsdR/S*, *relA*, *supE* und durch Einführung von amber- und ochre-Mutanten Rekombination, Modifikation und Restriktion so gestalten, daß eine verbesserte Transformation und Plasmidstabilität erreicht wird. Des Weiteren können durch Insertion von Genen der Transkriptions- und

- 17 -

Translationskontrolle, wie *lacJ^q* und *lacUV-T7*, in das Chromosom die Expression und Produktsynthese verbessert werden.

Die erfindungsgemäß gewonnenen L-Form-Stämme eignen sich zur Herstellung beliebiger Genprodukte, insbesondere zur Herstellung rekombinanter Proteine, vorzugsweise löslicher, extrazellulärer Proteine und besonders zur Herstellung membrangebundener Proteine. Die Proteine können als Biochemikalien für die molekularbiologische und medizinische Forschung, als Diagnostika, als Arzneimittel und als Enzyme mit Potential zur Stoffumwandlung eingesetzt werden.

Hierzu werden die Zellen zunächst auf an sich bekannte Weise mit einer für ein Genprodukt kodierenden Nucleotidsequenz transformiert, z.B. mit einem geeigneten Vektor, der das Produktgen unter Kontrolle eines oder mehrerer Promotors enthält. Der Vektor enthält vorzugsweise auch eine Gensequenz, die für ein Signalpeptid kodiert, das einen aktiven Transport des Genprodukts durch die Zytoplasmamembran in das Kulturmedium oder eine Verankerung des Genprodukts an der Membran ermöglicht (Membrananker). Der transformierte Stamm wird unter geeigneten Bedingungen kultiviert, dann ggf. die Expression der rekombinanten Proteine induziert, z.B. durch Zugabe eines Induktors, und anschließend das rekombinante Protein isoliert. Verfahren zur Gewinnung von Genprodukten sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Zellen sind in der Lage, posttranskriptionale Modifizierungsprozesse durchzuführen. Die L-Form-Membran ist in ihrem Lipidanteil so verändert, daß sie für die Insertion und Anreicherung von fremden Membranproteinen genügend Raum bietet und daß in bzw. an der Membran die für die Funktionalität essentiellen Faltungs- und Prozessierungsprozesse erfolgen können.

Die Konstruktion geeigneter Vektoren ist an sich bekannt. Hierzu wird mit üblichen gentechnischen Methoden (T. Maniatis,

- 18 -

E. Firtsch, und J. Sambrook 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor' Lab. Cold Spring Harbor N.Y.; F.N. Ansuel 1998, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons) das Strukturgenen eines zu exprimierenden löslichen oder membrangebundenen Proteins oder Fusionsproteins in ein für die Expression geeignetes Plasmid integriert. Die Promotoren müssen für die Produktgene, auch wenn deren Überexpression letal ist, gut regulierbar sein und damit ein Subklonieren ermöglichen. Bevorzugt sind Promotoren, deren Expressionsstart durch Zugabe eines induktiv wirkenden Substrats oder Substrat аналогons (Induktor) bzw. durch einen entsprechenden Substratshift erfolgt, z. B. lac-P/O und dessen Derivate wie lacUV, tac etc. (H.A. de Boer, L.J. Comstock, M. Vasser, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25), Induktion durch IPTG-Zusatz (Isopropyl- β -D-Thiogalactoside) bzw. Glucose/Lactose-Shift; oder tetA-P/O (A. Skerra, 1994, Gene 151, 131-135); Induktion durch Zusatz von aTC (anhydro-Tetracyclin); Promotoren, deren Expressionsstart durch Änderung der physiologischen Bedingungen eingeleitet wird z. B. λ P_L (E. Remaut, P. Stanssens, W. Fiers 1981, Gene 15, 81-93); Expressionsstart durch Inaktivierung des Repressormoleküls cI^{ts857} nach Temperaturerhöhung); cspA-P/O (J.A. Vanisa, F. Baneyx, 1996, Appl. Environ. Microbiol. 62, 1444-1447); Expressionsstart durch Temperaturabsenkung); Vhb "oxygen-regulated element" (C. Koshla, J. Curtis, P. Bydalek, J.R. Swartz, J.E. Bailey, 1990, Biotechnol. Bioeng. 48, 151-160); Expressionsstart durch Sauerstoffabsenkung, pO₂< 5% Sättigung; induzierbare Promotor-Hybride, die aus DNA-Sequenzen verschiedener Promotoren bestehen, z. B. P_{LtetO-1} aus tetA-P/O und P_L-P/O aus dem Phagen λ (R. Lutz, H. Bujard, 1997, Nucl. Acid. Res. 25, 1203-1210); konstitutive Promotoren und Promotorhybride, die ohne Induktion eine permanente Genexpression erlauben (z. B. P-lacI (lac-Repressor-Gen), P-bla (β -Lactamase-Gen), P-lacI/P-bla-hybrid, speA (*Streptococcus* Exotoxin A-Gen)).

Zwischen der P/O-Region und dem Startcodon der Proteinsynthese müssen desweiteren spezifische DNA-Sequenzen als ribosomale

- 19 -

Bindungsstelle (rbs; auch *Shine-Dalgano-Sequenz*, SD) eingefügt werden, die eine Bindung der mRNA an das Ribosom als Voraussetzung für den Proteinsynthesestart ermöglichen.

Die Expressionskassette (P/O, SD, Signalsequenz, Strukturgen) kann von Transkriptionsterminator-Strukturen flankiert werden, um mögliche Interferenzen mit benachbarten Expressionskassetten zu minimieren. Weiterhin können die für eine effektive Steuerung der P/O-Regionen notwendigen Regulatorgene (z. B. *lacI* oder *lacI^q* für *lacP/O* und *tacP/O*; *tetR* für *tetAP/O*; *cI^{ts857}* für *P_L* etc.) auf den gleichen oder anderen autonom replizierenden Vektoren lokalisiert oder in das Chromosom integriert sein.

Gensequenzen, die für Signalpeptide kodieren, werden N-terminal vor das Produktgen eingeführt. Als Signalpeptide für Genprodukte, die in das Kulturmedium sekretiert werden sollen, wie Fusionsproteine oder bestimmte Proteindomänen, z.B. den extramembranären Regionen von Rezeptoren, eignen sich prokaryotische oder eukaryotische Signalpeptide. Bevorzugt sind die Signalpeptide des OmpA Proteins (*ompA*), der Staphylokinase (*sak*), der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (*phoA*), der Streptokinase (*speA*) und der periplasmatischen Pectinlyase aus *Erwinia* (*pelB*) (A.M. Bushueva, A.B. Shevelev, J. Gumpert, G.G. Chestukina, C. Hoischen, M.V. Matz, M.V. Kuryatova und V.H. Stepanov, 1998, FEMS Letters 159, 145-150; M. Kujau, C. Hoischen, D. Riesenber und J. Gumpert, 1998, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 51-58; C.H. Klessen, K.H. Schmidt, J. Gumpert, H.H. Grosse und H. Malke, 1989, Appl. Environm. Microbiol. 55, 1009-1015). Zum Teil enthalten die Produktgene jedoch bereits natürliche Signalsequenzen, die einen Transport durch die Membran sicherstellen.

Für eine Verankerung Proteinen eignen sich besonders solche Signalpeptide die nicht durch L-Form-eigene Signalpeptidasen abgespalten werden können. Diese können aus herkömmlichen Signalpeptiden beispielsweise dadurch erhalten werden, daß die Schnittstellen für Signalpeptidasen beispielsweise durch den

- 20 -

Austausch von Aminosäuren so modifiziert werden, daß diese von den Signalpeptidasen nicht erkannt werden.

Zum besseren Nachweis und zur Aufreinigung des Genprodukts können an das Strukturgens codierende Sequenzen für entsprechende Peptide (z. B. c-myc, His-tag, Strep-tag) oder Proteine (z. B. GST) mit und ohne dazwischen liegenden Sequenzen für eine spezifische Peptidase-Abspaltung angefügt werden.

Im weiteren Verlauf der Vektorkonstruktion erfolgt die Integration dieser Expressionskassetten (Promotor-Signalsequenz-Produktgen-Konstrukte) in ein geeignetes Plasmid. Dieses muß zur Vermehrung in den L-Form-Zellen einen geeigneten Replikationsursprung und mindestens ein Selektionsgen enthalten. Für die L-Formen aus Gram-negativen Bakterien, insbesondere für *P. mirabilis* und *E. coli*, eignen sich vorzugsweise das *Cole1* Replicon (hohe Kopienzahl), das pBR322 Replicon (= *Cole1* + *rop* Gen, mittlere Kopienzahl) und die pIS1A und pSC101 Replicons (niedrige Kopienzahl). Für L-Formen von Gram-positiven Bakterien wie *Bac. subtilis* eignen sich Replikationsursprungssequenzen von Vektoren mit breitem Wirtsspektrum (z.B. pUB101 von Staphylokokken, pIP501, pAMβ1, pSM19035 von Streptokokken) oder für Streptomyzeten L-Formen die Replicons der Vektoren pIY101, pWOR und pSG5. Die Wahl des Replikationsursprungs erlaubt zusätzlich eine Variation der Expressionsstärke des Strukturgens über die Kopienzahl und damit der Gendosis.

Die Verwendung kompatibler Replikations-Origins und unterschiedlicher Selektions-Gene auf verschiedenen Vektoren ermöglicht den Einsatz dualer oder multipler Vektorsysteme in L-Form-Zellen für die Koexpression verschiedener Strukturgene (S. Sieben, R. Hertle, J. Gumpert und V. Braun 1998, Arch. Microbiol. 170, 236-242).

Als Selektionsmarker sind Resistenzen gegenüber β-Lactam-Antibiotika (z.B. Ampicillin) und Chloramphenicol für alle L-

- 21 -

Formen ungeeignet. Es müssen deshalb für die Plasmidkonstrukte geeignete Resistenzgene ermittelt werden, wobei vorzugsweise solche gegen Kanamycin, Erythromycin, Nourseothricin, Phleomycin und Neomycin eingesetzt werden.

Die Transformation der L-Form-Stämme mit dem Expressionsvektor erfolgt nach einer an sich bekannten Standardmethode (J. Gumpert, H. Cron, R. Plapp, H. Niersbach und C. Hoischen 1996, J. Basic Microbiol. 36, 88-98). Danach werden L-Form-Zellen mit Plasmid-DNA und Polyethylenglycol MG 6000 im Eisbad und bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von LFS-Medium erfolgt eine 1-3-stündige Bebrütung bei 37 °C, und danach wird diese Vermehrungskultur auf Selektivagarmedium ausplattiert.

Als Selektivantibiotikum werden entsprechend den Vektorkonstruktionen bevorzugt Kanamycin, Erythromycin, Nourseothricin und Neomycin verwendet. Die positiven Transformanten werden auf Agarmedium vermehrt und durch 2-5 maliges Übertragen in frisches Medium an das Wachstum in flüssigen Nährmedien adaptiert. Bevorzugte Wachstumsmedien sind LFS-Medium und BHIB-Medium mit Zusätzen von 0,3-1% Hefeextrakt, 1-2% Saccharose und 2-50 µg/ml Selektivantibiotikum. Die Agar-Kulturen oder Submers-Kulturen werden auf das Vorhandensein der intakten Plasmid-DNA mit Restriktionsanalyse und Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Eine zweite Transformationsmethode wird in der Weise ausgeführt, daß der Transformationsansatz (Plasmid-DNA/L-Form-Zellen/PEG) nach Aufenthalten im Eisbad und bei 37 °C mit LFS-Medium 1:1 aufgefüllt und 2 - 6 Stunden bei 37 °C bebrütet wird. Danach erfolgen die Zugabe von 2 - 10 ml LFS-Medium mit 2 - 50 µg/ml des entsprechenden Selektivantibiotikums und weitere Inkubation unter Schüttelbedingungen bei 30 - 37 °C über 10 - 48 Stunden. Mit dieser Methode werden Mischpopulationen von Transformanten erhalten, von denen durch Ausplattieren auf Selektivmedium Einzelkolonie-Kulturen gezüchtet werden können.

- 22 -

Im Falle der Verwendung von dualen Vektorsystemen (z. B. der gekoppelten und unter Rifampicin-Zusatz spezifischen Expression von Strukturgenen unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase / T7-Promotor-Systems auf den Plasmiden pGP1-2 und pSAT14), werden die L-Form-Zellen zunächst mit einem Plasmid transformiert und selektiert. In diese Transformanten erfolgt danach die Transformation des zweiten Plasmids unter Selektion auf das Vorhandensein der Selektionsmarker beider Plasmide. Im Ergebnis werden L-Form-Transformanten-Kulturen bereitgestellt, die einen oder mehrere Expressionsvektoren enthalten.

Für eine maximale Produktsynthese können die Wachstums- und Fermentationsbedingungen für die einzelnen Proteine unterschiedlich sein. Sie hängen davon ab, ob die Produktsynthese wachstumsgekoppelt ist oder vorwiegend in der stationären Wachstumsphase erfolgt, ob das Produkt effizienter bei Temperaturen von 26 bis 30 °C oder von 37 °C gebildet wird, und ob das Proteinprodukt pH-empfindlich ist und, z.B. wie Prochymosin, bei pH-Werten über pH 7,3 autokatalytisch abgebaut wird. Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäß modifizierten Zellen in der Lage sind, sich rasch und ohne Probleme an die für das jeweilige Protein optimalen Wachstumsbedingungen anzupassen.

Die Überexpression von Fremdproteinen in den L-Form-Zellen ist so kontrollierbar, daß im Verlaufe der Isolierung und Kultivierung der Transformanten und ihres Wachstums in flüssigen Medien kein rekombinantes Protein gebildet wird. Die Proteinsynthese wird erst bei Erreichen hoher Zellzahlen induziert.

Das Wesen der Kultivierung liegt darin, daß die Kultur möglichst hohe Zellzahlen (10^9 - 10^{10} Zellen/ml) erreicht, daß diese zum richtigen Zeitpunkt zur Expression und Überproduktion angeregt werden, daß die Proteine in hohen Konzentrationen sekretiert bzw. in die Membran eingebaut, bzw. auf der Membran präsentiert werden, daß ein Abbau der Proteine vermieden wird und daß die Kulturüberstände bzw. die L-Form-Zellen mit maximalem Gehalt an

- 23 -

Proteinprodukten für die anschließende Isolation bereitgestellt werden.

Die konkreten Bedingungen und Parameter sind für die eingesetzten Produzentenstämme (L-Formen von *E. coli*, *P. mirabilis*, *B. subtilis*) und für die Proteinprodukte unterschiedlich und müssen im Einzelfall ermittelt und optimiert werden. Im einzelnen betrifft dies die Zusammensetzung der Nährmedien (insbesondere C- und N-Quellen), die Konzentration der Selektivantibiotika (0,5-50 µg/ml), optimale Wachstums- und Synthesetemperaturen (20-40 °C, vorzugsweise 26 - 37 °C), Regelung des pH-Wertes (pH 6,0-8,5, vorzugsweise pH 7,5), optimaler Sauerstoffeintrag durch Wahl der Fermentationsbehälter, Schüttelfrequenzen (50-330 U/min), Rührgeschwindigkeiten (200-600 U/min), Belüftungsraten (konstanter p_{O₂}), Zufütterung von C- und N-Quellen (insbesondere Glukose), Zeitpunkt zur Induktion der Genexpression (z. B. durch Zugabe von IPTG, anhydro-Tetrazyklin, 20-60 min Temperaturerhöhung auf 42 °C) sowie die Länge der Synthesezeit (4-50 Std.). Das Wachstum und die Produktsynthese können in dieser Stufe durch zusätzliche Faktoren optimiert werden, z. B. niedermolekulare Effektoren, Vitamine, Aminosäuren-gemische, Lipidkomponenten, Thiolreagenzien und nichtmetabolisierbare Zucker.

Eine Verbesserung der Bildung von funktionell aktiven Genprodukten kann auch durch Zugabe von Zuckern erreicht werden, beispielsweise von 1 - 5% Saccharose. Es wird angenommen, daß solche Zucker die Faltungsprozesse verschiedener Proteine verbessern.

Bei hoher struktureller und segregativer Stabilität der Plasmide in den L-Form-Zellen (z. B. von pHCl, pSIS2sak, pMK7GFP) können Wachstum und Produktsynthese auch ohne Zugabe der Selektivantibiotika (Kanamycin, Neomycin, Nourseothricin usw.) erfolgen.

Die anschließende Isolierung und Reinigung der Genprodukte ist davon abhängig, ob das Protein als lösliches extrazelluläres oder

- 24 -

als membrangebundenes Protein, z.B. peripheres bzw. integrales Membranprotein anfällt.. Da die L-Form-Zellen im Gegensatz zu allen anderen Produzentenzellen in der Regel außer der zytoplasmatischen Membran keine weiteren Zellorganellen wie Geißeln, Fimbrien, Sporen, Zellwände und innere Membransysteme besitzen, entfallen die Reinigungsschritte, die zur Abtrennung dieser Komponenten erforderlich sind. Die Membranen und Membranproteine können relativ einfach durch Zellyse (osmotischer Schock, Ultraschall, French Press) und anschließende Zentrifugation und Waschen in Pufferlösungen isoliert und gereinigt werden.

Im Falle der Gewinnung von extrazellulären löslichen Proteinen werden die L-Form-Zellen durch Zentrifugation (6000 g/10 min) vom Nährmedium abgetrennt und aus diesem Überstand mit den bekannten Methoden der Proteinisolierung (Fällung, Sedimentation, Extraktion, Filtration, elektrophoretische Auftrennung; Affinitäts-, Ionenaustausch-, Größenausschluß- und hydrophobe Chromatographie etc.) die Proteine separiert und gereinigt.

Zur Isolierung membrangebundener Proteine werden die L-Form-Zellen in gleicher Weise durch Zentrifugation sedimentiert und gewaschen. Die Gewinnung der Protein-Membrankomplexe erfolgt durch Lyse der Zellen (osmotische Lyse, Ultraschallbehandlung, Einfrieren und Auftauen, French-Press-Behandlung). Die Membranen (leere Zellen) werden anschließend in magnesiumhaltigen (z.B. 0,1 % MgSO₄) Pufferlösungen gewaschen.

Der Nachweis der membrangebundenen Proteine erfolgt mit bekannten Methoden, vorzugsweise durch immunochemische Methoden auf der Basis synthetischer Peptide, (Western-Blot, Dot-Blot, ELISA, synthetische Sequenz-spezifische Antikörper), zytchemische Methoden (Immunoelektronenmikroskopie mit Immunogold, Fluoreszenzmikroskopie), radiochemische Methoden (Markierung mit S³⁵ Methionin oder H³-Leucin) und funktionellen Tests (enzymatische Reaktionen, Bindungskinetiken).

- 25 -

Die weitere Isolierung und Anreicherung richtet sich nach dem Verwendungszweck, d.h. ob das Proteinprodukt als reines Protein gewonnen werden soll oder als Komplex mit Membranen oder Lipidkomponenten. Die Protein-Membran-Komplexe liegen in der Regel als Vesikel ($0,01\text{-}5\mu\text{m}$ Durchmesser) vor und können in Pufferlösungen (TRIS, BBS, mit Zusätzen von 0,1 % MgSO_4 , Phenylmethysulfonfluorid, Dithiothreitol) als Suspension stabil erhalten bzw. aufbewahrt werden.

Die Membranvesikel können durch Inversion mittels French-Press-Behandlung oder Einfrieren-Auftauen in inside-out Vesikel umgewandelt werden. Dabei werden die zytoplasmaseitigen inneren Bereiche der Proteinmoleküle an der äußeren Oberfläche der Membranvesikel frei zugänglich. Derart hergestellte invertierte Protein-Membran-Komplexe machen Interaktionsstudien und Strukturaufklärung der zytoplasmaseitigen extramembranären Domänen möglich.

In einer weiteren Variante des Verfahrens kann die Lipidmatrix der Membranen durch geeignete Detergentien (SDS, Plantaren, Tween 20, Triton X 100) aufgelöst werden. Dabei kommt es zu einer Freisetzung der integralen und peripheren Membranproteine, und diese können als lösliche oder aggregierte Proteinmoleküle isoliert und gereinigt werden.

In einem alternativen Schritt des Verfahrens können die auf diese Weise isolierten membrangebundenen Proteine wieder in Lipidstrukturen mit definierter molekularer Zusammensetzung rekonstituiert werden. Auf diese Weise lassen sich ihre richtige molekulare Konfiguration und ihre Funktionalität erhalten bzw. wiederherstellen. Viele Membranproteine sind nur dann funktionell aktiv, wenn sie in einem geeigneten Lipidmilieu eingebettet sind. Als Lipide eignen sich insbesondere Phospholipide mit ausgeprägter Tendenz zur Bildung unilamellarer Bilayer-Vesikel (z.B. Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidyl-cholin).

Die erfindungsgemäßen L-Form-Stämme und das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Genprodukten eignen sich besonders zur Herstellung von membrangebundenen Proteinen. Unter membrangebundenen Proteinen werden solche Proteine verstanden, die an Biomembranen gebunden sind. Hierunter fallen sowohl die sogenannten Membranproteine, die aufgrund ihrer chemisch physikalischen Eigenschaften an Membranen binden, entweder integral oder peripher, als auch Proteine, die selbst nicht an Membranen binden und erst durch geeignete Membrananker an die Membran gebunden werden.

Der Begriff Membranprotein umfaßt integrale oder periphere Membranproteine, wie Rezeptoren (z.B. Acetylcholin, Bradykinin, Endothelin, Hormone), Carrierproteine (z.B. für Aminosäuren, Zucker, Ionen, Peptide, kompatible Solute, Elektronentransport), Ionenkanäle, ABC-Transporter, Preproteintranslokatoren.

In besonderer Weise eignen sich das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäßen L-Form-Stämme zur Expression und zur Gewinnung von bakteriellen "outer-membrane-proteins" (Omps), insbesondere OmPs mit β -Faltblattstruktur. Diese Proteine sind in der äußeren Membran von Gram-negativen Zellen lokalisiert. Überraschenderweise war es erstmals möglich, OmPs in großen Mengen auch in löslicher Form zu exprimieren. OmPs sind mit herkömmlichen bakteriellen Expressionssystemen nur schlecht in reiner Form herstellbar (Meens et al. 1997, Applied. Environment. Microbiol. 63: 2814-2820). Die Verwendung von L-Form-Stämmen zur Herstellung von OmPs, insbesondere OmPs in löslicher Form und OmPs mit β -Faltblattstruktur, wurde bisher nicht beschrieben und ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Outer-membrane-proteins (Omps) Gram-negativer Bakterien, speziell pathogener Arten eignen sich in löslicher oder membrangebundener Form für Interaktionstests, Struktur-Funktionsstudien, Diagnostik und Vakzinierung.

Zu der zweiten Gruppe membrangebundener Proteine zählen beispielsweise lösliche Proteine und hydrophile Proteine, die erst nach dem Verknüpfen mit beispielsweise einer hydrophobe Aminosäuresequenzen zu einer Bindung an Lipidmembranen in der Lage sind. Die hydrophobe Aminosäuresequenz dient hierbei als Membrananker.

Bevorzugte Membrananker sind homologe und heterologe Signalpeptide, wie beispielsweise das eukaryotische Signalpeptid des SERP-Proteins aus *Plasmodium falciparum*, die Schnittstellen besitzen, die von den bakteriellen Leaderpeptidasen nicht erkannt werden.

Weiter bevorzugte Membrananker sind Sequenzen homologer und heterologer transmembraner Regionen von Membranproteinen wie hydrophobe Transmembranhelices von homologen und heterologen prokaryotischen und eukaryotischen Membranproteinen, vorzugsweise Helix 1 oder Helices 1 bis 3 der Lactose-Permease LacY von *E. coli*, der Präprotein-Translokase SecY von *E. coli* oder des Schwärmproteins CcmA von *P. mirabilis*.

Ebenfalls geeignet sind synthetische hydrophobe Aminosäuresequenzen mit 8 bis 150, vorzugsweise 10 bis 120, ganz besonders bevorzugt 10 bis 30 Aminosäuren, wie beispielsweise dem Leucin-Zipper. Als ausreichend hydrophob werden Aminosäuresequenzen dann angesehen, wenn sie gemäß den von G. von Heijne publizierten Verfahren an Biomembranen binden (von Heijne G., "Assembly of Integral Membrane Proteins" in Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics, Springer Verlag Berlin 1994, J.A.F. Op den Kamp (Herausgeber), Seiten 199 bis 205; Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., Von Heijne G., Elofsson, A. Protein Eng. 1997, 10: 673-676. Besonders bevorzugte Membrananker sind in den Ausführungsbeispielen beschrieben.

Die Verankerung von Proteinen an Membranen ermöglicht die Oberflächenpräsentation (Surface Display) der Proteine auf den L-Form-Membranen. Durch das Fehlen von Zellwandkomponenten (Peptidoglycan, äußere Membran, Lipopolysaccharide) und extrazel-

lulären Proteasen ist es mit den L-Form-Stämmen möglich, die interessierenden Proteine direkt auf der Zytoplasmamembran zu präsentieren. Das Fehlen antigener Komponenten ist im Hinblick auf medizinischen Anwendungen wie Vakzinierungen und diagnostische Methoden vorteilhaft. Das eröffnet gegenüber herkömmlichen Gram-positiven und Gram-negativen bakteriellen Surface-Display-Systemen erhebliche Vorteile. Zudem lassen sich hohe Konzentrationen der Proteine auf der L-Form-Membran erzielen (bis etwa 100 mg/l). Es wurde überraschend gefunden, daß bei der Verankerung von Proteinen in der Zytoplasmamembran mit heterologen und homologen Ankersequenzen die Proteine zum größten Teil auf der Außenseite der zytoplasmatischen Membran angeordnet und biologisch Aktiv sind. Die Proteine sind damit für die Wechselwirkung mit extrazellulären Komponenten, Funktionstests und Interaktionsstudien einfach zugänglich. Die Verankerung erwies sich zudem als sehr stabil, und die Proteinmoleküle wurden beispielsweise im Verlauf der Fermentation nicht von den Membranankern abgerissen.

Durch die Oberflächenpräsentation von Proteinen ist beispielsweise die Gewinnung neuartiger Impfstoffe und Interaktions-Screeningsystemen möglich. Hierzu wird das gewünschte Antigen auf der Membran von L-Form-Zellen verankert, und die Zellen werden dann zur Impfung eingesetzt. Dabei werden vorzugsweise lediglich die aktiven, d.h. antigenen Komponenten beispielsweise von Proteinen zur Verankerung verwendet. Durch die hohe Konzentration an Protein auf der Membran ist nur eine geringe Zellzahl zur Impfung erforderlich, und der Gebrauch patogener Zellen oder Proteine kann ganz vermieden werden.

Zu den Proteinen, die sich für das Surface-Display besonders eignen gehören neben verschiedenen antigenen Determinanten von pathogenen Organismen für Vakzinierungen besonders auch single chain Antikörper und Antikörperfragmente, heterologe Enzyme, Polyhistidyl Tags und Peptidbibliotheken. Die so modifizierten L-Form-Zellen eignen sich für die Verwendung in Diagnostik und

- 29 -

Therapie und zur Herstellung von Mitteln für die Diagnostik und Therapie, als Biokatalysatoren, und für die Anwendung in Interaktionsscreenings.

Die Verwendung von L-Form Zellen zur Oberflächenpräsentation von Proteinen wurde bisher nicht beschrieben und ist daher ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ebenso wie Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Proteinen unter Verwendung von L-Form Zellen und die Verwendung von L-Formen mit an der Zytosplasmamembran verankerten Proteinen zur Herstellung von Mitteln für Therapie und Diagnostik. Diese Verfahren umfassen die oben beschriebenen Schritte zur Herstellung von Proteinen unter Verwendung von L-Formen, wobei die Zellen mit dem Genkonstrukt aus einer Ankersequenz und einer Proteinsequenz transformiert werden. Die Zellen werden bei der Isolation des Genprodukts vorzugsweise nicht durch Tenside oder dergleichen aufgeschlossen sondern als ganzes isoliert.

Zur Oberflächenpräsentation von Proteinen eignen sich alle L-Formen von Bakterien, insbesondere stabile L-Formen und ganz besonders stabile Protoplasten-Typ-L-Formen. Bevorzugte und besonders bevorzugte L-Formen sind die oben als Ausgangsstämme zur Herstellung modifizierter L-Formen genannten, insbesondere die erfindungsgemäß modifizierten L-Formen.

Die erfindungsgemäßen L-Form-Stämme und das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Genprodukten eignet sich weiterhin:

zur Herstellung von Proteinen zur Verwendung als Arzneimittel und Diagnostika, wie beispielsweise pharmazeutisch wirksamen Enzymen und Enzymaktivatoren (Exo- und Endopeptidasen, Staphylokinase, Streptokinase, Hämolsinaktivator ShlB), Wachstumsfaktoren, Peptidhormonen, Antikörperkonstrukten (z.B. Fab-, Fv-Fragmenten, deren single chain Varianten, Miniantikörpern, Diabodies, kompletten Antikörperproteinen), membranständigen Fusionsproteinen und anderen rekombinanten Fusionsproteinen, mit mono-,

- 30 -

bi- oder multivalente Bindungseigenschaften für die medizinische Diagnostik oder Therapie (z.B. von Tumoren), dazu zählen u.a. Rezeptoren mit Liganden-Bindungseigenschaften;

zur Herstellung und Präsentation von Immundeterminanten wie Oberflächenantigenen von pro- und eukaryotischen Organismen (z.B. des SERP- und MSP1-Proteins des Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, viralen Hüllproteinen (z.B. vom HIV-Virus und anderen Retroviren), viralen Transkriptasen zur Antikörperbildung und Immunisierung;

zur Herstellung von Enzymaktivatoren und Enzyminhibitoren wie z.B. Proteaseinhibitoren;

zur Herstellung von Enzymen und Proteinen der Signalübertragung;

und zur Herstellung von Precursorproteinen, d.h. Vorstufen von reifen, biologisch aktiven Proteinen, die aufgrund der fehlenden extrazellulären proteolytischen Aktivität der L-Form-Zellen erhalten bleiben und als inaktive Form für therapeutische und diagnostische Zwecke eingesetzt und im Organismus bzw. Diagnostiktest erst aktiviert werden.

Die gewonnenen Proteine sind funktionell aktiv und enthalten keine störenden Membrankomponenten, wie z.B. Lipopolysaccharide der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, die Gewinnung und Funktionalität der Proteinprodukte stören. Die genannten Genprodukte werden entweder in das Kulturmedium transloziert oder in membrangebundener Form isoliert.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Die Beispiele wurden unter Verwendung der hinterlegten L-Form-Stämme durchgeführt, wobei diese durch die Verfahrensschritte (a) und (b) ausgehend von den bekannten Stämmen erhalten wurden.

- 31 -

Beispiel 1 zeigt, daß die modifizierten Stämme genotypisch verändert sind.

Beispiels 2 belegt, daß sie phänotypische und genotypische Membranveränderungen aufweisen.

In Beispiel 3 wird gezeigt, daß erfindungsgemäß modifizierte Stämme besser fermentierbar sind und mehr Produkt bilden als die Ausgangsstämme.

Beispiel 4 beschreibt die kontrollierte Genexpression und Produktsynthese mit erfindungsgemäß modifizierten Stämmen.

Beispiel 5 beschreibt die Verankerung rekombinater Proteine in der Zytoplasmamembran unter Verwendung homologer und heterologer Peptidsequenzen von integralen Membranproteinen als Membrananker.

Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1

Vergleich der chromosomalen DNA (Genotyp) des modifizierten L-Form-Stamms *Escherichia coli* LWF+WEI mit der des Ausgangsstamms *Escherichia coli* LWF+

Die Pulsfeldgelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten über einen großen Längenbereich auf einem Gel. Das erlaubt eine vergleichende Analyse der genomischen DNA von Arten und Stämmen.

Veränderungen in der DNA, die Auswirkungen auf die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen haben, ergeben veränderte Bandenmuster. Damit werden nach Restriktasebehandlung Aussagen über die genetische Diversität eines Stammes möglich (Lezhava,

- 32 -

A., J. Bacteriol. 1995, 177, 6491-6498; Pandza, K, Microbiol. 1997, 143, 1493-1501).

Material und Methoden

Die L-Form-Stämme *E. coli* LWF+WEI und *E. coli* LWF+ und der zellwandhaltige Elternstamm *E. coli* WF+ werden unter gleichen Bedingungen angezüchtet. Die Kultur erfolgte in Stielbrustflaschen (100ml) mit 30 ml LFS-Medium und Zusätzen von Pferdese- rum (6% V/V), Hefeextrakt (0,7%) und Saccharose (4%) bei 37° C auf einem Rotationsschüttler bei 200 U/min. Von jedem Stamm werden nach einer 3 - 6 stündigen Kultivierung Proben in einem Äquivalent entsprechend einer optischen Dichte von 2, gemessen bei 550 nm, genommen, um vergleichbare finale Biomassen zu erhalten. Nach einer Zentrifugation der Zellsuspension bei 3000 x g, 4°C und 10 min wurde das Pellet vorsichtig in einer osmotisch gepufferten Hefe-EDTA-Saccharose-Lösung (HES-Puffer nach Evans, M., Dyson, P. 1993, Trends in Genetics , 9, 72-78) resuspendiert, mit fast erstarrter Agarose (0,7%, BioRad) vermischt und anschließend bei 4°C verfestigt. Dadurch lassen sich unspezifische Bandenmuster als Folge von Scherwirkungen vermeiden. Die Proben des Elternstammes *E. coli* WF+ wurden danach mit Lysozym behandelt (Serva Electrophoresis, 1 mg/ml HES, 2 Std. bei 37°C). Der nachfolgenden alkalischen Lyse der Zellen innerhalb des Agaroseblockes (etwa 0,2 cm³), kombiniert mit einem hinreichenden Proteinverdau (1 mg Proteinase K (Merck Eurolab)/ml N-Lauroylsarcosinat-EDTA-Glycin-NaOH-Lösung (NDS-Lösung; Evans, M., Dyson, P. 1993, Trends in Genetics 9,72-78) für 16 Std. bei 37°C), schlossen sich die nötigen Waschschrifte an: 1 x 15 min mit NDS, 1 x 15 min mit Hefe-EDTA-Lösung (HE-Puffer), 1 x 1,5 Std. mit HE-Puffer + 50 µg Pefabloc (Roche Diagnostics)/ml bei 37°C, 5 x 30 min mit HE. Nach einer solchen Behandlung lag die DNA in einer Form vor, die ein sequenzspezifisches Schneiden mit Restriktasen erlaubt. Es wurde eine ausreichende Menge von 60 Units der jeweiligen Restriktase einem Agarosestück (etwa 0,05

- 33 -

cm³) zugesetzt und die Inkubationszeit von 16 Std. gewählt, um eine vollständige Spaltung zu erreichen. Die Auftrennungsbedingungen der DNA-Fragmente in einem 1,5% Gel (SeaKemGold, FMC Bioproducts) bei 170 V, 22 Std., Pulszeiten von 2,5-38 s und 12°C beruhen auf optimierten Erfahrungswerten. Es wurde eine Pulsfeldgelektrophoreseapparatur des Typs CHEF-DRII (BioRad) verwendet.

Ergebnisse:

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen (SdAI von MBF Fermentas, alle restlichen von New England Biolabs) haben folgende unterschiedliche spezifische Spaltsequenzen:

SpeI =	A/CTAGT	XbaI = T/CTAGA
NotI =	GC/GGCCGC	SwaI = ATTT/AAAT
AvrII =	C/CTAGG	AscI = GG/C CGGCC
SfiI =	GGCCNNNN/NGGCC	SdAI = CCTGCA/GG

Die Restriktionsendonukleasen XbaI, NotI, SwaI, AvrII, AscI, SfiI und SdAI ergaben bei beiden L-Form-Stämmen und dem Elternstamm weitestgehend identische Grund-Fragmentmuster. Das ist ein Nachweis dafür, daß es sich taxonomisch um denselben Organismus, d. h. *E.coli*, handelt (Abb 1, 2).

Abbildung 1 zeigt Spaltmuster chromosomaler DNA des modifizierten L-Form-Stammes *E. coli* LWF+WEI (2, 4, 6, 8) und des Ausgangsstammes *E. coli* LWF+ (3, 5, 7, 9) nach Verdau mit jeweils 60 Units der Restriktionsendonukleasen SwaI (2, 3), SpeI (4, 5), XbaI (6, 7) und NotI (8, 9) (alle von New England Biolabs); die Spuren 1 und 10 zeigen Längenmarker, Spur 1: Low Range (New England Biolabs), Spur 10: Lambda-Ladder (New England Biolabs).

Abbildung 2 zeigt die Spaltmuster chromosomaler DNA des wandhaltigen Elternstammes *E. coli* WF+ (2, 5, 8), des L-Form-

- 34 -

Ausgangsstammes *E. coli* LWF+ (3, 6, 9) und des weiterentwickelten Stammes *E. coli* LWF+WEI' (4, 7, 10) nach Verdau mit jeweils 60 Units der Restriktionsendonukleasen SpeI (2, 3, 4), NotI (5, 6, 7) und XbaI (8, 9, 10) (alle von New England Biolabs), Spur 1: Längenmarker Low Range (New England Biolabs).

Nach Verdau mit SpeI ist ein klarer Unterschied der Banden im Größenbereich zwischen 240kb und 290kb im Stamm *E. coli* LWF+WEI und im Stamm *E. coli* LWF+ zu sehen. Dieser reproduzierbare Unterschied ist ein eindeutiger Hinweis darauf, daß der weiterentwickelte Stamm *E. coli* LWF+WEI im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* LWF+ genotypisch verändert ist (Abb.1., siehe Pfeile).

Spaltungen mit SpeI, NotI und XbaI ergaben bei den L-Form-Stämmen ein Muster, das jeweils gleich verschieden zu dem der N-Form ist (Abb.2., siehe Kreuze). Nur SpeI zeigte einen anderen Unterschied zur N-Form (Abb.2., siehe Kreise).

Ein Vergleich der Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Bandenmustern zeigt eindeutig, daß die Stämme *E. coli* WF+, *E. coli* LWF+ und *E. coli* LWF+WEI taxonomisch der gleichen Spezies angehören, daß beide L-Form-Stämme gegenüber dem N-Form Elternstamm genotypische Unterschiede zeigen und daß der weiterentwickelte L-Form-Stamm *E. coli* LWF+WEI gegenüber dem Sammlungsstamm *E. coli* LWF+ genotypisch verändert ist.

Ausführungsbeispiel 2

Unterschied in den Proteinkomponenten in zytoplasmatischen Membranen der L-Form-Stämme *Escherichia coli* LWF+ und *E. coli* LWF+WEI

Neben der vergleichenden Analyse der chromosomal DNA nach Restriktasebehandlung erlaubt auch die vergleichende Analyse der Proteinmuster zweier Stämme Rückschlüsse auf genotypische und

- 35 -

phänotypische Veränderungen. Unter Anwendung der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) ist eine detaillierte Trennung und Charakterisierung von Proteingemischen möglich. Im ersten Schritt erfolgt dabei die Trennung nach dem isoelektrischen Punkt (pI) in einem Fokussiergel (IEF). Im zweiten Schritt werden dann in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) die fokussierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MW) getrennt.

Im Ausführungsbeispiel wurden die Membranproteine des Ausgangsstammes *E. coli* LWF+ mit denen des erfindungsgemäß modifizierten Stammes *E. coli* LWF+WEI verglichen. Die Beschränkung auf die Membranproteine ist deshalb gewählt worden, weil die L-Form-Membranen nur ca. 500 verschiedene Proteine enthalten, während in den ganzen Zellen ein Vielfaches davon vorliegt. Des Weiteren sind die Membranproteine zum größten Teil essentiell und in der Regel ständig in der Membran vorhanden. Reproduzierbare qualitative Unterschiede im Muster der Membranproteine sind deshalb ein Hinweis auf strukturelle und funktionelle Unterschiede im Genom.

Material und Methoden

Anzucht der Zellen:

Die Zellen der beiden Stämme werden unter identischen Bedingungen gezüchtet (BHI-Medium mit Zusätzen von 0,5% Hefeextrakt und 5% v/v Pferdeserum, Bebrütung im Schüttelinkubator bei 37 °C), nach 24 Std. abzentrifugiert (6000 x g, 10 min), in 0,4 M Saccharose gewaschen und durch osmotischen Schock (0,05 M TRIS/HCl-Puffer pH 7,0 mit Zusatz von 0,1 % MgSO₄ und 30 µg/ml DNase) lysiert. Durch Ultrazentrifugation (80000 x g, 20 min, 4°C, Beckmann Optima XL80) und Waschen in 0,05 M TRIS/HCl-Puffer mit 0,1 % MgSO₄ erfolgt die Isolierung und Reinigung der Membranen.

- 36 -

Probenbehandlung:

Die gereinigten Membranfraktionen werden zunächst mit der 5-fachen Einwaagemenge dest. Wassers gewaschen und danach 45 min bei 5 °C mit 14000 Upm zentrifugiert (Sorvallzentrifuge Typ RMC 14). Das Pellet wird wie unten beschrieben weiterverarbeitet.

Solubilisierung der Membranproteine:

Das gewaschene Membranpellet wird in der 6-fachen Menge Solubilisierungspuffer (9,5 M Harnstoff, 4 % 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS, Serva), 5 % einer 40 %igen Ampholytlösung 3-10, 100 mM Dithiolthreitol (DTT) aufgenommen und zusätzlich fester Harnstoff in einer Menge von 45 % der Membraneinwaage zugegeben, um die Harnstoffkonzentration der Gesamtlösung wieder auf ≈ 9,5 M zu bringen. Die Suspension wird durch Schütteln bei Raumtemperatur in Lösung gebracht und 2 Std. stehengelassen mit wiederholten Schüttelvorgängen. Anschließend wird die klare Lösung 50 min mit 75000 Upm in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (Typ Beckmann Optima TLX bei 20 °C). Der Überstand enthält die unter den gewählten Bedingungen gelösten Membranproteine. Jeweils 15 - 20 µl dieser Lösung werden auf die Fokussierungsgel aufgetragen und zweidimensional analysiert.

Elektrophoresebedingungen:

Zur Analyse der Proteinkomponenten wurde das Investigator 2-D Electrophoresis System von Oxford Glyco-Systems verwendet.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension): Keine Präfokussierung, Strom maximal 110 µA/Gel, Spannung konstant 1000 V (17 Std.) und 2000 V (30 min), d. h. 18000 Vh insgesamt.

SDS-PAGE (2. Dimension): 11,5 % Polyacrylamid-Gele (Duracryl 30,65 % T), kein Stacking-Gel, Spannung maximal 500 V, 20 W/Gel.

- 37 -

Alle Gele werden mit Coomassie Brilliant Blau G-250 nach der Methode von Neuhoff et al. (Electrophoresis 1988, 9, 255-262) gefärbt, bei welcher die kolloidalen Eigenschaften dieses Farbstoffes zur Anwendung kommen.

Ergebnisse

Abbildung 3 zeigt Membranproteine von *Escherichia coli* LWF+ (Gel A1) und *E. coli* LWF+WEI (Gel B1) nach Auftrennung mit 2D-PAGE in dem pI-Bereich 4,8 - 6,7 und dem MW-Bereich 31 - 60 kDa. Die schwarzen Pfeile markieren Spots bzw. Spotmuster, die nur im Stamm *E. coli* LWF+ vorliegen, und die weißen Pfeile dokumentieren Proteine, die für den Stamm *E. coli* LWF+WEI spezifisch sind. Der Vergleich der Spotmuster in den Gelbereichen $3,5 < \text{pI} < 7,0$ und $22 \text{ kDa} < \text{MW} < 80 \text{ kDa}$ ergab in den Membranen beider L-Form-Stämme ca. 150 detektierte Proteine. Die Mehrzahl der Spots ist identisch. Von den zwölf divergierenden Proteinen lagen sechs nur im Ausgangsstamm *E. coli* LWF+ und sechs nur im Stamm *E. coli* LWF+WEI vor.

In Abbildung 3 sind die Gelbereiche $4,8 < \text{pI} < 6,7$ und $31 \text{ kDa} < \text{MW} < 60 \text{ kDa}$ als Ausschnitte vergrößert, und sie zeigen jeweils vier differierende Proteine. Auf Grund der völlig identischen Anzuchtbedingungen und Probenbehandlungen und der mehrfach reproduzierten Daten muß aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß die Zusammensetzung der Membranproteine im Stamm *E. coli* LWF+WEI signifikant verändert ist und daß dies auf Veränderungen im Genotyp beruht.

Ausführungsbeispiel 3

Vergleich von Wachstum und Produktbildung der rekombinanten L-Form-Stämme *Proteus mirabilis* LVIWEI und *Proteus mirabilis* LVI

Die Gewinnung rekombinanter Proteine, die zur Vakzinierung eingesetzt werden können, ist eine vordringliche Aufgabe, insbesondere für bisher dafür nicht zugängliche Krankheiten wie z.B. Malaria. Das MSP1- Gen kodiert ein Protein, das von den Merozoiten-Stadien des Erregers *Plasmodium falciparum* synthetisiert wird und ein Kandidat für Vakzinierungsstrategien gegen Malaria darstellt. Zur Gewinnung des Proteins, d.h. in der Ausführung des 42 kDa großen C-terminalen Fragmentes, wurden die Stämme *P. mirabilis* LVI und *P. mirabilis* LVIWEI mit dem Plasmid p6H-42-3D7 transformiert. Im Beispiel wird die Fermentation beider Transformanten verglichen und dokumentiert, daß der neue Stamm *P. mirabilis* LVIWEI bessere Eigenschaften im Hinblick auf Wachstum und Produktbildung hat.

Material und Methoden

Die Stämme *P. mirabilis* LVIWEI (p6H-42-3D7) und *P. mirabilis* LVI (p6H-42-3D7) enthalten das gleiche Plasmid mit dem Gen für das 42 kDa Fragment des Malaria-Surface-Proteins 1 (MSP1) in der Allel-Variante 3D7 (MAD20) des humanspezifischen Erregers *Plasmodium falciparum* (Pan, W. et al. 1999, Nucleic Acids Research 27, 1094-1103). Am 42 kDa-Fragment ist N-terminal das *ompA*-Signalpeptid fusioniert, was für eine Sekretion in das Medium notwendig ist. Die Gewinnung der Transformanten erfolgte nach den gleichen Schritten wie sie in der Patentbeschreibung und im Ausführungsbeispiel 5 beschrieben sind. Sie sind hinsichtlich Plasmididentität (Restriktionsmuster) und der unter Kontrolle des *P_LtetO-1* Promotors (Lutz R. and Bujard, H. 1997, Nucleic Acids Research 25, 1203-1210) induzierbaren Produktbildung getestet. Zur Fermentation wurden zuerst Vorkulturen aus den an Wachstum

- 39 -

in flüssigen Medien adaptierten Transformanten hergestellt. Eine erste Vorkultur erfolgte bei 37°C (100 ml Glaskolben mit 35 ml BHI-Medium und Zusätzen von 50 mM Na-Phosphat pH 7,2 und 50 µg/ml Kanamycin) über 24 Std. als Schüttelkultur bei 220 rpm. Nachfolgend wird eine zweite Vorkultur in gleichem Maßstab bei 28°C für 24 Std. kultiviert. Diese dient als Inokulum für die dritte Vorkultur (500 ml Glasflaschen mit 150 ml Fermentationsmedium, 12 Std. bei 26°C kultiviert). Nach einer mikroskopischen Kontrolle der Vorkulturen erfolgt die Beimpfung der Fermenter.

Der eingesetzte Fermenter (BIOSTAT B Gerät, Braun BBI Melsungen) ist ausgerüstet mit Rührkessel-Kulturgefäß B2 (Arbeitsvolumen 2 l), Belüftungseinrichtung, Rührwelle mit zwei Paddelrührern B5 im Medium und einem 6-Blatt-Scheibenrührer B2 im Schaumbereich, einer pH-Sonde (Ingold 405D-K8S/200), einer pO₂-Sonde (Mettler Toledo 34 100 3057), einer Schaumsonde, einer Gasmischstation mit 2 ml Mass-flow Controller für Luft und Sauerstoff und Zuluftfilter 0,2µm (Sartorius Midisart 2000), Abluftkühler mit Schaumfalle, Sterilfilter (Gelmann Acro 50ST), Abgasanalysensystem (Hartmann und Braun, Frankfurt) mit Uras 10p für CO₂-Analyse und Magnos 6G für O₂-Analyse, Kühlwasserkreislaufkühler KK4s (Medingen, 6°C), Dosiereinrichtung für Glukose mit Peristaltikpumpe WM 101U/2rpm (Watson-Marlow, Silikonschlauch ID= 1,6 mm) und Steuerung über Schaltuhr, off-line Analytik für Glukose mit ECA 2000 Glukose-Analysator (Medingen).

Das Medium im Fermenter ist 1,35 l BHIB (35 g/l) gelöst in Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,2) mit Zusätzen von Glukose (0,5%), Saccharose (1%), Hefeextrakt (0,1%), Na-Fumarat (40 mM), Kanamycin (50 µg/ml) und Ampicillin (200 µg/ml). Es wird mit 150 ml der 12-stündigen Vorkultur beimpft zu einer Startzellkonzentration entsprechend einer OD_{550 nm} = 0,5.

Das Fermentationsregime umfaßt: Temperatur = 26°C; pH-Wert = konstant pH 7,2 (+/- 0,3), reguliert mit H₂SO₄ (12%) und NaOH (12%); Belüftungsrate = 20 SLPM konstant ; Rührgeschwindigkeit

- 40 -

= 100 - 500 rpm, gekoppelt an die festgelegte pO₂-Konzentration von 20%; Induktorzugabe anhydro-Tetracyclin (400 µg/l, nach erster Verdopplung der OD und 400 µg/l nach zweiter Verdopplung der OD, danach 12 Std. Weiterführung der Fermentation). Als Antischaummittel wurde Ucolub nach Bedarf zugegeben. Zu den in Abb. 4a und 4b angegebenen Meßpunktzeiten werden Proben entnommen (10 ml) und die Zellkonzentration als optische Dichte (OD als Extinktion bei 550 nm, Photometer Spekol 11 Zeiss) als Maß für die Biomasse bestimmt.

Die Fermentationsproben werden nach Zentrifugation (6000 x g, 10 min) in den Überstand mit löslichem Produkt und in das Sediment mit zellgebundenem Produkt fraktioniert. Die Produktbildung wird durch SDS-Gelelektrophorese und Western blot mit produktspezifischen Antikörpern und quantitativer Auswertung der Banden (Scan- und Auswerte-Software Phoretix 1D, NonLinear Dynamics Ltd, UK) ermittelt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Fermentationskinetik und der Produktbildung mit *Proteus mirabilis* LVI(p6H-42-3D7) (a) und *P. mirabilis* LVIWEI (p6H-42-3D7) (b) sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Mengen an synthetisierten löslichem und zellgebundenem Malariaprotein sind als relative Einheiten ("units"= Fläche x Farbintensität der gescannten Produktbanden im Western blot) angegeben.

1. Unter weitestgehend gleichen Bedingungen (Vorkultur aus intakten L-Form-Zellen, gleichen Wachstumsmedien, Animpfdichten, Wachstumstemperaturen, pH-Regelung, Glukosezufütterung, Induktion der Genexpression und Regelung des Sauerstoffeintrages mit Schwellenwert von pO₂=20% durch Kopplung an Erhöhung der Rührgeschwindigkeit) zeigt die Transformante *P. mirabilis* LVIWEI

- 41 -

(p6H-42-3D7) des weiterentwickelten Stammes deutlich bessere Eigenschaften.

2. Im Vergleich zum Stamm *P. mirabilis* LVI (p6H-42-3D7) zeigt sie ein schnelleres Wachstum unmittelbar nach dem Start der Fermentation, eine ausgeprägte exponentielle Wachstumsphase bis 12 Std., sehr viel höhere Zellzahlen und Biomassewerte, verbunden mit wesentlich stärkerer CO₂ -Bildung und damit aktiveren Stoffwechsel, sowie bessere Verträglichkeit für Antischaummittel. Die Transformante des Ausgangsstamm *P. mirabilis* LVI (p6H-42-3D7) zeigt dagegen nach Zugabe von Antischaummittel eine Abnahme der Stoffwechselaktivität, verdeutlicht durch das Absinken der CO₂ -Bildung und des O₂ -Verbrauches.

3. Die Transformante *P. mirabilis* LVIWEI (p6H-42-3D7) erzielt eine wesentlich höhere Volumenausbeute an synthetisiertem Malariaprotein. Das betrifft sowohl die Menge an zellgebundenem Proteinprodukt (Abb. 4a und 4b) als auch die Menge an löslichem Produkt, die in beiden Stämmen nur gering bleibt .

Ausführungsbeispiel 4:

Funktionalität unterschiedlicher Expressionsvektoren mit regulierbarer Expressionsleistung in L-Form-Zellen von *Proteus mirabilis* LVIWEI

Für die erfolgreiche Verwendung von Bakterienzellen zur Synthese rekombinanter Proteinprodukte ist eine kontrollierbare Überexpression der Produktgene von entscheidender Bedeutung. Das Beispiel 4 dokumentiert, daß eine solche induzierbare Produktsynthese auf der Grundlage der für *E. coli* optimierten Genkonstruktionen und Regulationsprinzipien auch in L-Form-Zellen von *P. mirabilis* LVIWEI möglich ist.

- 42 -

A) Vektorkonstruktion und Nachweis der regulierbaren Expressionsleistung:

Methodik:

Die eingesetzten Vektoren wurden mit bekannten gentechnischen Methoden konstruiert (Maniatis et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor N.Y.; Ausubel, F.N., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons).

Als einfacher Nachweis für die Funktionalität der Vektoren wurde das Gen für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP; Crameri et al., 1996, *Nature Biotechnol.* 14, 315-319), stellvertretend für die Gene unterschiedlichster rekombinanter Proteine, in die Expressionskassetten unter der Kontrolle verschiedener Promotoren einkloniert. Das korrekt gefaltete, funktionale GFP besitzt ein chromogenes Zentrum, das bei Anregung im UV-Bereich (395nm) grünliches Licht emittiert (509nm). Der Nachweis und die Stärke der grünen Fluoreszenz sind ein Maß der Effizienz der Vektoren und der Produktbildung in L-Form-Zellen hinsichtlich der Induktion des Transkriptionsstarts (mRNA-Bildung), der Translation (Proteinsynthese nach kodierender mRNA-Sequenz) sowie der korrekten Faltung des Proteins.

Für eine induzierbare und gut regulierbare Proteinbildung wird das GFP-Gen unter die Kontrolle der Promotoren *lac-P/O* (+ *lacI*-Repressor-Gen; Repressor-Inaktivierung durch Zugabe von 5mM IPTG) bzw. *tetA-P/O* (+ *tetR*-Repressor-Gen, Repressor-Inaktivierung durch Zugabe von 200µg/ml anhydro-Tetracyclin [aTC]) gestellt. Für eine konstitutive Produktbildung steht das GFP-Gen unter Kontrolle der Promotor-Region des *lacI*-Repressor-Gens (*P-lacI*) bzw. noch zusätzlich unter Kontrolle der Promotor-Region des β-Lactamase-Gens (*P-bla*) als Tandem-Hybrid (*P-lacI / P-bla*).

- 43 -

Als Beispiel für die Regulation der Expressionsstärke über den Gendosis-Effekt, d.h. einer Beeinflussung der Synthese des rekombinanten Proteins durch unterschiedliche Anzahl (Kopien) der Vektor-DNA mit dem kodierenden Gen pro Zelle, werden Vektoren für die lac-P/O-kontrollierte GFP-Expression mit den Replikationsorigins ColE1, pBR322 und p15A konstruiert.

Die Übertragung der Vektoren in die L-Form-Stämme erfolgte wie im Ausführungs-beispiel 5 beschrieben. Alle Vektoren trugen das Kanamycin-Resistenzgen als Selektions-marker.

Ergebnisse:

L-Form-Zellen von *Proteus mirabilis* LVIWEI mit den entsprechenden Vektoren werden in einer Schüttelkultur (LFS-Medium mit 0,5% Hefeextrakt; 18 Std. bei 37°C) ohne Induktoren kultiviert. Von diesen Kulturen und dem plasmidfreien Kontrollstamm werden je 0,1 ml Zellsuspension auf LFS-Medium-Agar-Platten (ohne bzw. mit Induktor-Zusatz) ausgestrichen. Nach 24 Std. Wachstum bei 37°C erfolgt die Anregung mit UV-Licht zur Emission des grünen Fluoreszenz-Lichtes und die Photographie mit einer CCD-Kamera.

Die auf den Agarplatten in Abbildung 5 gewachsenen und induzierten Zellen von *P. mirabilis* LVIWEI enthalten Vektoren mit folgenden Merkmale (Tabelle 1).

Tabelle 1: Promotor-Gen-Konstrukte zur GFP-Synthese in *P. mirabilis* LVIWEI

Nr.	Vektor	Replikationsorigin	Kopien/Zelle	Expressionskontrolle durch	Induktion
0	---	---	---	---	---
1	pMK310gfp	p15A	5 - 10	<i>lacP/O</i> (+ <i>lacI</i> -Repressor)	+ IPTG
2	pMK311gfp	pBR322	30 - 70	<i>lacP/O</i> (+ <i>lacI</i> -Repressor)	+ IPTG
3	pMK31gfp	ColE1 (pUC)	120 - 200	<i>lacP/O</i> (+ <i>lacI</i> -Repressor)	+ IPTG
4	pMK3c2gfp	ColE1 (pUC)	120 - 200	P- <i>lacI</i> / P- <i>bla</i>	2x konstitutiv
5	pMK3c-gfp	ColE1 (pUC)	120 - 200	P- <i>lacI</i>	konstitutiv
6	pMK7gfp	ColE1 (pUC)	120 - 200	<i>tetP/O</i> (+ <i>tetR</i> -Repressor)	+ aTC

Die aus Abb. 5 zusammengefaßten Ergebnisse dokumentieren, daß

- Zellen ohne GFP-Expressionsvektoren (Nr. 0) unter allen Bedingungen keine Fluoreszenz zeigen,
- die drei Konstrukte mit dem *lac*-P/O (Nr. 1-3) nur nach Induktion mit 1-10 mM IPTG das GFP synthetisieren,
- dabei mit Plasmiden, die in hoher Kopiezahl vorliegen (Nr. 3-6, mit ColE1 / pUC ori), mehr GFP gebildet wird als mit solchen, die nur in wenigen Kopien in den Zellen vorhanden sind (Nr. 1, mit p15A ori),
- auch mit dem *tetA*-P/O eine spezifische Genexpression möglich ist (Nr. 6) und
- in den Zellen, die Vektoren mit dem GFP-Gen unter Kontrolle des konstitutiven *lacI*-P/O enthalten (Nr. 4), unter allen getesteten Bedingungen eine GFP-Synthese erfolgt.

Diese Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß die für die üblichen *E. coli*-Wirtsstämme konstruierten und optimierten Expressionsvektoren auch in den L-Form-Zellen von *P. mirabilis* LVIWEI effektiv arbeiten.

- 45 -

B) Segregative und strukturelle Stabilität der Expressionsvektoren in L-Form-Zellen

Methodik:

Von *P. mirabilis* LVIWEI (pMK3c2GFP) mit konstitutiver GFP-Expression (Nr. 4 in Tab. 1 und auf Agar-Platte in Abb. 5) werden Schüttelkulturen in LFS-Medium mit und ohne Selektivantibiotikum (50 μ g/ml Kanamycin) wie unter Beispiel 5 beschrieben angelegt, die jeweils wiederum nach 24 Std., d.h. nach ca. 4-5 Zell-generationen, in frisches Medium übertragen und erneut, insgesamt über 12 Passagen, kultiviert werden. Nach jeder 3. Passage erfolgen Verdünnungsreihen (10^{-3} bis 10^{-7}) der Kulturen auf LFS-Medium-Agar-Platten mit und ohne Selektivantibiotikum, und nach 3-tägigem Wachstum werden unter UV-Licht die fluoreszierenden bzw. nicht fluoreszierenden Einzelkolonien ausgezählt (Abb. 6).

Ergebnisse:

Der Verlauf des Anteils fluoreszierender Einzelkolonien, d.h. der plasmidhaltigen Zellen in den Kulturen mit und ohne Selektionsdruck, ergibt auch über lange Kultivierungsdauer (mit über 50 Generationen ohne Selektivantibiotikum) keine signifikanten Unterschiede. Dies wird in Abbildung 6 dokumentiert. Die grüne Fluoreszenz aller plasmidhaltigen Einzelkolonien verdeutlicht damit die strukturelle und funktionelle Stabilität der Vektoren.

C) Vergleich der Vektor-Effizienz in L-Form- und N-Form-Zellen:

Methodik:

Als Beispiel für die Produktivität des L-Form-Expressionssystems wurde die GFP-Expression mit verschiedenen Vektoren in L-Form-

Zellen von *P. mirabilis* LVIWEI mit der Expression in N-Formzellen vom *E. coli* Produktionsstamm RV308 verglichen. Beide Zelltypen werden unter gleichen Bedingungen in Komplexmedium kultiviert und die GFP-Expression induziert. Die Bestimmung der Zellkonzentration der Kulturen (g Biotrockenmasse / l) erfolgte durch Absorptionsmessung bei 550nm. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet, mittels Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen, die GFP-Aktivität (Fluoreszenz) am Fluoreszenz-Photometer quantifiziert und die der Aktivität zugrunde liegende Menge des synthetisierten GFP-Totalproteins über denaturierende SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Gelauswertung und einer Eichkurve quantifiziert. Die Menge an synthetisierten funktionalem GFP wird auf die eingesetzte Biomasse der *P. mirabilis* L-Form-Zellen bzw. der *E. coli* N-Form-Zellen bezogen (spezifische Aktivität).

Ergebnisse:

Die in Tabelle 2 aufgeführten Werte an funktionalem GFP (mg GFP / g Biotrockenmasse) zeigen die gleiche Effizienz der Expressionsvektoren (Beispiele: pMK31GFP (IPTG-Induktion), pMK7GFP (aTC-Induktion) bzw. pMK3c2GFP (konstitutiv)) für die rekombinante Proteinbildung in den weiterentwickelten L-Form-Stämmen wie für bereits etablierte N-Form-*E.-coli*-Expressionssysteme und -Produktionsstämme.

Tabelle 2: Vergleich der Synthese-Effizienz für GFP von verschiedenen Vektorkonstrukten in *P. mirabilis* LVIWEI und *E. coli* RV308 in mg GFP / g Biotrockenmasse.

Vektor	<i>P. mirabilis</i> L VI WEI	<i>E. coli</i> RV308
pMK31GFP	41,8	37,9
pMK7GFP	57,0	42,3
pMK3c2GFP	38,7	26,7

Ausführungsbeispiel 5

Herstellung von löslichen, funktionell aktiven, rekombinanten Proteinen (Surface-Display) mit Protoplastentyp L-Formen von *Proteus mirabilis* LVIWEI und *Escherichia coli* LWF+WEI

Das Beispiel beschreibt die Herstellung von rekombinanter Staphylokinase in membrangebundener Form. Als L-Form-Zellen wurden die Stämme *E. coli* LWF+WEI und *P. mirabilis* LVIWEI verwendet. Staphylokinase ist ein medizinisch bedeutsamer Plasminogenaktivator (15 kDa), der von L-Form-Zellen als extrazelluläres, lösliches, funktionell aktives, rekombinantes Genprodukt synthetisiert werden kann (Sieben, S., Dissertation, Universität Jena, 1998). Beim Translokationsprozess wird das 27 Aminosäuren lange Signalpeptid proteolytisch abgetrennt.

Material und Methoden

In dem ersten Schritt wird die DNA-Sequenz (Behnke, D. und Gerlach, D., Mol. Gen. Genetics 1987, 210, 528-534) des reifen Proteins (Aminosäuren 28-163) mittels PCR (Boehringer, Expand High Fidelity PCR Kit) amplifiziert. Durch Auswahl von geeigneten Primern wird das *sak*-Konstrukt modifiziert, um die anschließende Fusion mit den Membrananker-DNA-Sequenzen über eine PstI-Schnittstelle am 5'-Ende und die Integration in das Expressionsplasmid pF003-Kan über eine HindIII-Schnittstelle am 3'-Ende zu ermöglichen (Tab. 1). Dieses *sak*-Fragment ist die Grundlage für alle Fusionsproteine. Durch die Insertion der PstI-Schnittstelle wird gleichzeitig in alle Konstrukte eine Spacersequenz von zwei Aminosäuren zwischen Membrananker und Sak eingebaut.

Im zweiten Schritt erfolgt die Bereitstellung von Membrananker-Sequenzen. Als solche Ankersequenzen werden die Helix 1 (Aminosäuren 1-51; LacYH1) und die Helices 1-3 (Aminosäuren 1-127; LacYH1-3) der Laktose-Permease LacY aus *E. coli* verwendet. Andere

Ankersequenzen sind die Helix 1 (Aminosäuren 1-74; SecYH1) und die Helices 1-3 (Aminosäuren 1-153, SecYH1-3) der Preprotein-Translokase SecY aus *E. coli* sowie die Helix 1 (Aminosäuren 1-34; CcmAH1) des Schwärmproteins CcmA von *P. mirabilis* zuzüglich eines zusätzlichen Spacers von 5 Aminosäuren Länge. Die entsprechenden genauen Sequenzen sind in Abbildung 7 zusammengestellt. Die DNA der Membrananker wird mittels PCR aus genomischer DNA von *E. coli* DH5 α und *P. mirabilis* VI isoliert (Quiagen Genomic DNA Handbook, 1997). Hierfür werden Primer (Tab. 3) benutzt, die die Integration in das Expressionsplasmid pF003-Kan über eine am 5'-Ende eingefügte NdeI-Schnittstelle und die Fusion mit dem *sak*-Fragment über eine am 3'-Ende eingefügte PstI-Schnittstelle ermöglichen.

Tabelle 3: Übersicht über Primer, die bei der Amplifizierung und Modifizierung der Fusionsfragmente verwendetet wurden.

Fragment	Bezeichnung	Primersequenz		Länge bp	Inserierte Schnittstelle
Staphylokinase + 2 As Spacer (As 28 – 163)	Sak	Sense	CGCCTGCAGTCAGTTCAATTG ACAAAGGA	30	PstI
		Antisense	CGCAAGCTTTTATTCTTTCTA TAACAAACCTT	33	HindIII
Laktose-Permease Helix 1 (As 1 – 51)	LacYH1	Sense	GGAATTCCATATGTACTATTAA AAAAACACAAACTTTT	38	NdeI
		Antisense	CGCCTGCAGGCTGATATGGTTG ATGTCATG	30	PstI
Laktose-Permease Helices 1 – 3 (As 1 – 127)	LacYH1-3	Sense	GGAATTCCATATGTACTATTAA AAAAACACAAACTTTT	38	NdeI
		Antisense	CGCCTGCAGGTATTGTAACAGT GGCCCGAAGATAAA	36	PstI
Preprotein-Translokator Helix 1 (AS 1 – 74)	SecYH1	Sense	CGCGCATATGGCTAAA- CAACCGGGATTAGATTTCAA	37	NdeI
		Antisense	CGCCTGCAGACGGCTGAGAGC ACCACCAGAGAACATGTT	39	PstI
Preprotein-Translokator Helices 1 – 3 (As 1 – 153)	SecYH1-3	Sense	CGCGCATATGGCTAAA- CAACCGGGATTAGATTTCAA	37	NdeI
		Antisense	CGCCTGCAGGCCGGGTTAAC ACCAGGCCTGCATACC	39	PstI
Schwärmprotein Helix 1 + 5 As Spacer (As 1 – 34)	CcmAH1	Sense	CGCCATATGGATAA- TAAGCGAACACAGCGG	30	NdeI
		Antisense	CGCCTGCAGTTCTGGTGGTG CTCTCAC-CAGCTATTGATATCG	45	PstI

- 49 -

Im dritten Schritt wird das *sak*-Fragment in den Vektor pF003 einkloniert, amplifiziert und anschliessend im Expressionsvektor mit den verschiedenen modifizierten Membranankerfragmenten fusioniert (Tab. 4; Abb. 8). Die Membrananker-*sak*-Fusions-Gene stehen unter der Kontrolle des *tac* Promotors und sind damit durch IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid) induzierbar.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Fusionspartner und die entstandenen Expressionsplasmide

Ausgangs-plasmid	Fusionspartner		Fusionsprodukt	Expressionsplasmid
pF003-Kan	LacYH1	Sak	LacYH1-Sak	pFLacYH1-Sak
	LacYH1-3	Sak	LacYH1-3-Sak	pFLacYH1-3-Sak
	SecYH1	Sak	SecYH1-Sak	pFSecYH1-Sak
	SecYH1-3	Sak	SecYH1-3-Sak	pFSecYH1-3-Sak
	CcmAH1	Sak	CcmAH1-Sak	pFCcmAH1-Sak

Mit den in Tabelle 4 beschriebenen Expressionsplasmiden der pF-Serie erfolgt dann im Schritt 4 die Transformation in die L-Form-Zellen von *P. mirabilis* LVIWEI und *E. coli* LWF+WEI. Transformiert wird mit der PEG-Methode (Gumpert et al., aa0). Die Isolierung der Transformanten wird auf BHI-Agarplatten mit Zusätzen von Pferdeserum (8%), Hefeextrakt (0,5%) und Kanamycin (0 – 50 µg/ml) durchgeführt. Einzelne Transformantenkolonien werden danach auf BHI-Agarplatten mit den gleichen Zusätzen an Serum und Hefeextrakt sowie Kanamycin (50 µg/ml) übertragen und 1-3 mal passagiert, bis dichtes Wachstum als Kolonierasen erreicht ist. Die Flüssigkeitskultur der Transformanten wird in der Weise erhalten, daß ein Agarblöckchen mit reichlich Koloniewachstum in 30 ml BHI-Medium mit Zusätzen von Hefeextrakt (0,5%) und Kanamycin (50 µg/ml) eingebracht und unter Schütteln bebrütet (37°C) wird. Nach 2-4 Passagen unter den gleichen Wachstumsbedingungen werden so Flüssigkeitskulturen erhalten, die zu Zellkonzentrationen von

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von modifizierten L-Form-Bakterienstämmen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) man einen an ein komplexes Nährmedium adaptierten L-Form-Bakterienstamm alternierend bei unterschiedlichen Temperaturen im Temperaturbereich von 20 bis 40 °C kultiviert, und
 - b) bei ansteigender hydromechanischer Belastung der Zellen fermentiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt (a) und (b) eingesetzte L-Form-Bakterienstamm eine stabile Protoplasten-Typ L-Form ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der L-Form-Bakterienstamm eine L-Form von *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Nocardia asteroides*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces hygroscopicus* oder *Thermoactinomyces vulgaris* ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der L-Form-Bakterienstamm eine L-Formen von *P. mirabilis LVI*, *P. mirabilis L99*, *E. coli LWF+*, *E. coli LWF-* oder *Bac. subtilis L170* ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schritte (a) und (b) in dieser Reihenfolge durchführt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man den Schritt (a) in der Weise durchführt, daß man die Temperatur alternierend zwischen zwei Temperatu-

INTERNATIONAL FORM

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Address: Beutenbergstr. 11 07708 Jena		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 13364 Date of the deposit or the transfer: 2000-03-06
III. VIABILITY STATEMENT		
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2000-03-06 ² . On that date, the said microorganism was		
<input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no longer viable		
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴		
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY		
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2000-03-10

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- ² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- ³ Mark with a cross the applicable box.
- ⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

INTERNATIONAL FORM

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: L99WEI	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 13364
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2000-03-06 (Date of the original deposit)¹.</p>	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2000-03-10</p>

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

4,8

← pl. →

6,7

60

Al

MW/kDa

31

60

B1

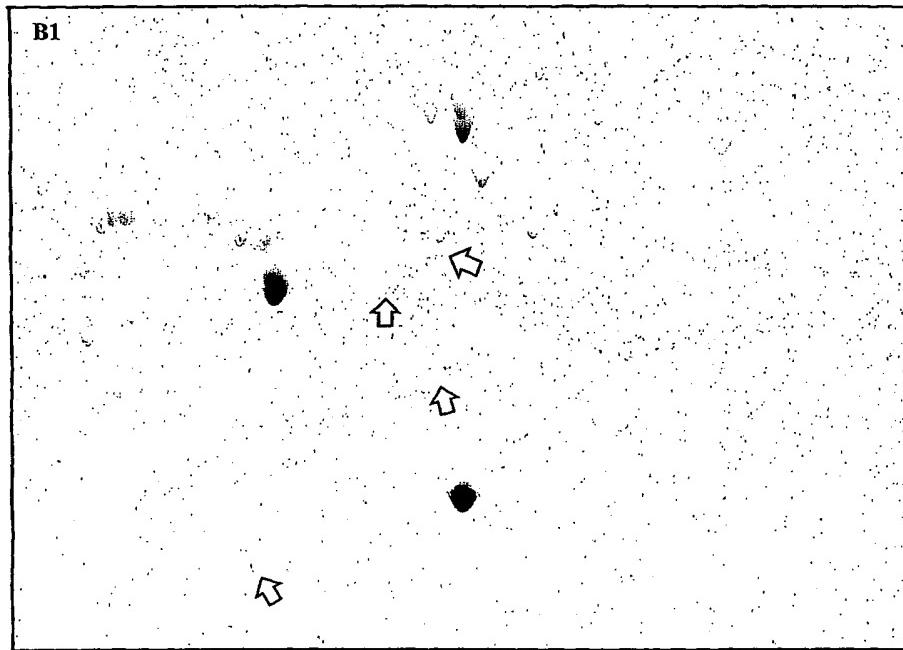
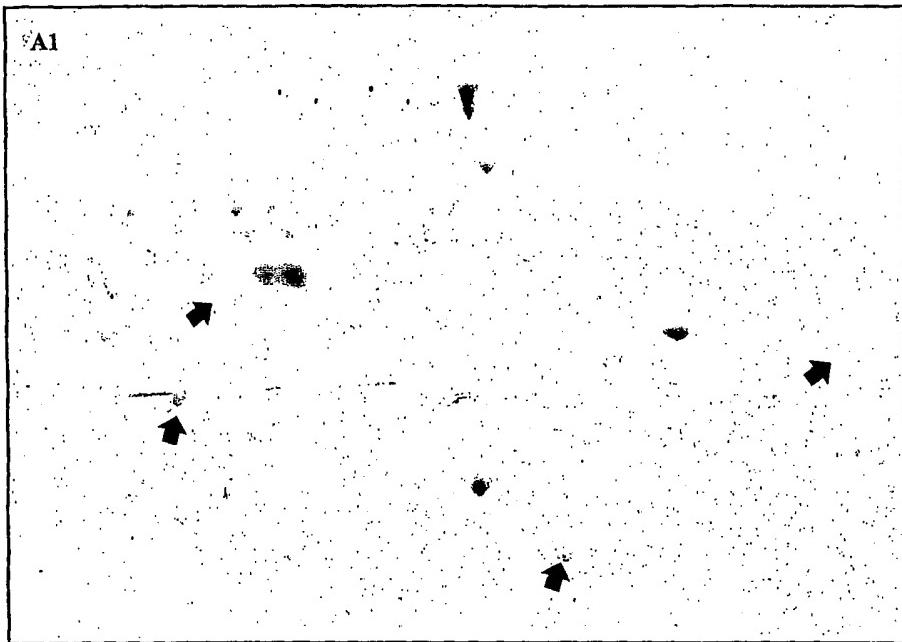
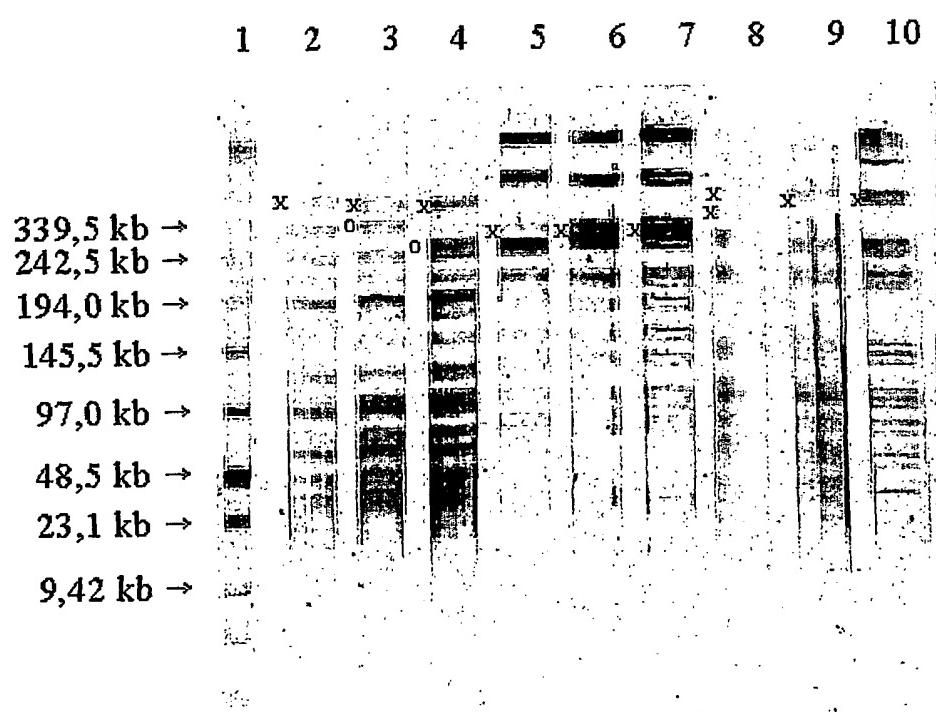


ABB. 3

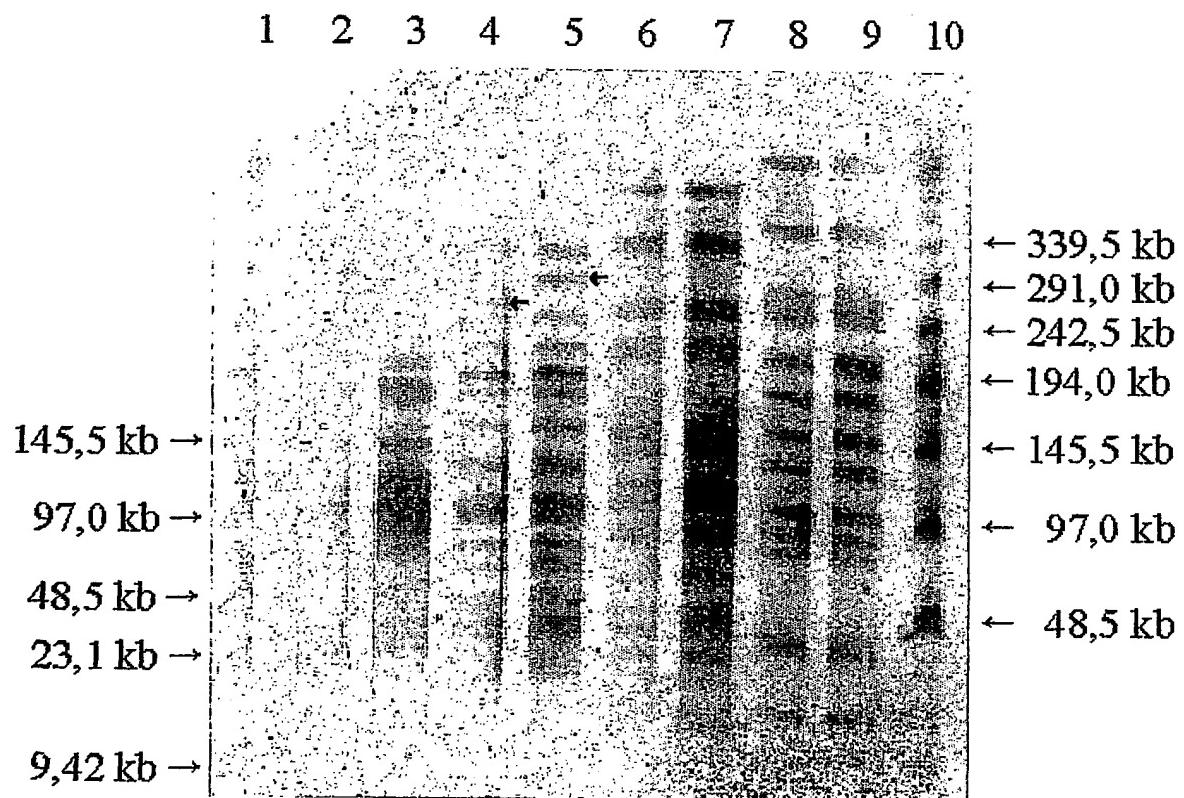
ERSATZBLATT (REGEL 26)

Abb. 2.



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Abb. 1.



ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 50 -

10^{10} /ml wachsen. Im Fall der Transformanten von *E. coli* LWF+WEI sind die Zusätze von Kanamycin geringer (1 - 5 µg/ml).

Im 5. Schritt wird die Flüssigkeitskultur der Transformante zur Synthese des Fusionsproteins angeregt und in die Fraktionen Kulturmedium (Überstand), L-Form-Zellen, L-Form-Membranen und Zytoszol aufgetrennt. Dazu werden Transformanten, z.B. *P. mirabilis* LVIWEI (pFCcmAH1-Sak) in Glaskölbchen (100 ml) oder Fermenter (21 Nettovolumen) in BHI-Medium mit Zusätzen von Hefeextrakt (0,5%) und Kanamycin (50 µg/ml) inkubiert (37°C). Nach 2 - 6 Std. erfolgte durch Zugabe von IPTG (3 mM) die Induktion der Genexpression von den Fusionsproteinen. Aus den Kulturen wurden nach 8, 24 und 48 Std. Proben entnommen. In ihnen erfolgt durch Zentrifugation (6000 g, 10 min) eine Abtrennung der Zellen als Pellet und des Kulturmediums als Überstand.

Die Zellen werden einmal in Saccharoselösung (0,4 M) in dest. Wasser gewaschen und anschließend zur Trennung von Zytoszol und Membranen aufgeschlossen. Der Aufschluß der Zellen von *P. mirabilis* LVIWEI erfolgt durch Ultraschallbehandlung mit einem Branson Sonifier 240. Die Zellen werden dazu in TRIS/HCl Puffer (0,05 M, pH 7,0) mit Zusatz von MgSO₄ (0,1%) resuspendiert (OD bei 600 nm um 10, Zellkonzentration um 10^{10} /ml, 10 ml Probenmenge) und 1 - 3 min mit Energiestufe 3 beschallt, wobei sich das Glasgefäß in einem Eisbad befindet. Durch Kontrolle von Proben im Phasenkontrastmikroskop (Vergrößerung 2000 x) wird der Zeitpunkt ermittelt, zu dem die Zellen zerstört sind und nur noch Membranvesikel vorliegen.

Im Falle der Transformantenkulturen von *E. coli* LWF+WEI erfolgt der Zellaufschluß durch osmotische Lyse. Dabei werden die mit 0,4 M Saccharose gewaschenen Zellen in TRIS/HCl Puffer (0,05 M, pH 7,0) mit Zusätzen von 0,1% MgSO₄ und 30 µg/ml DNase (Boehringer Mannheim) resuspendiert (Zellkonzentration 10^7 /ml) und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Durch fortlaufende mikroskopische Kontrolle wird wiederum der Zeitpunkt der weitgehenden

- 51 -

Zellyse bestimmt. Mit den so erhaltenen Suspensionen erfolgt dann die Trennung der Membranvesikel vom Zytoplasma durch Ultrazentrifugation bei 80000 g in einer Optima XL80 Zentrifuge (Beckmann).

Im 6. Schritt erfolgt der biochemische und funktionelle Nachweis des Genproduktes in den 4 Fraktionen. Dazu werden 30 µl Probe im Western blot (Ausubel, F. M. 1999; Current Protocols in Molecular Biology) im SDS-Gel (13 – 15%) aufgetrennt und die Proteine nach Transfer auf eine PVDF-Membran (Millipore) mit Staphylokinase-spezifischen primären Antikörpern und sekundären Antikörpern, die an alkalische Phosphatase gekoppelt sind und somit eine Farbreaktion bewirken können, sichtbar gemacht.

Der Nachweis der funktionellen Aktivität erfolgt mit dem Milchagar-Plattentest. In Agarplatten (15 cm Durchmesser), die mit aqua dest. Agar (30 ml, 1,5%) mit Zusätzen von Magermilch (10%) und Plasminogen ($10^{-1}\mu\text{g}/\text{ml}$; Boehringer Mannheim) gefüllt sind, werden Löcher (9 mm Durchmesser) ausgestanzt, in die 50 µl der Proben gegeben werden. Nach 2 – 18 Std. Inkubation (37°C) erfolgt die Ausmessung der Aufklärzonen. Durch biologisch aktive Staphylokinase wird das Plasminogen aktiviert, und das entstehende Plasmin spaltet das Casein der Milch und führt zu Aufklärzonen um das Stanzloch. Durch Vergleich mit Staphylokinase-Standards kann so die biologische Aktivität der Staphylokinase quantitativ bestimmt werden.

Im 7. Schritt wird die Lokalisation des Fusionsproteins an der Außenseite der L-Form-Membran durch Trypsinverdau und durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie mit Immunogoldmarkierung am Replikon untersucht. Zusätzlich wird die Membranständigkeit des Fusionsproteins durch den Nachweis der Rekonstitution in micellenbildenden Detergentien wie Octylglycosid oder Triton X100 bewiesen.

Ergebnisse

In Abb. 7 sind die Aminosäure und Nukleotidsequenzen der Membrananker und der Fusionsproteine dokumentiert. Mit der Sequenz der maturen Staphylokinase, die den Aminosäuren 28 – 163 des kompletten Proteins entspricht (nichtmarkierte Aminosäure- und Nukleotidsequenzbereiche), wurden N-terminal über eine eingefügte PstI Schnittstelle (Sequenzbereiche fett, kursiv, unterstrichen) und einem dementsprechenden kurzen Aminosäurelinker die folgenden membranspannenden Domänen fusioniert (Sequenzbereiche doppelt unterstrichen): a) Helix 1 (Aminosäuren 1 – 51; LacYH1) der Laktosepermease, b) Helices 1 – 3 (Aminosäuren 1 – 127; LacYH1-3) der Laktose-Permease, c) Helix 1 (Aminosäuren 1 – 74; SecYH1) der Preprotein-Translokase, d) Helices 1 – 3 (Aminosäuren 1 – 153; SecYH1-3) der Preprotein-Translokase und e) Helix 1 (Aminosäuren 1 – 34; CcmAH1) des Schwärmproteins mit einer zusätzlichen Spacersequenz von fünf Aminosäuren (Sequenzbereiche fett, kursiv).

In Abb. 8 ist beispielhaft das Expressionsplasmid pFLacYH1-3-Sak zur Synthese von rekombinanter membrangebundener Staphylokinase mit L-Form-Zellen von *E. coli* LWF+WEI dargestellt. *Ptac* : tac-Promotor; *lacYH1-3* : Helices 1-3 der Laktose-Permease (As 1 – 127); *sak* : Gen für Staphylokinase (As 28 – 163); Spacer : 2 As; *lacYH1-3-sak* : Fusionsprotein; *rrnBT* : Transkriptionsterminator des *rrnB* Operons; *kann* : Kanamycinresistenz-Kassette; *ori* : Replikationsorigin von pBR322; *lacIq* : Lac-Repressor mit modifiziertem Promotor.

Abb. 9 dokumentiert die Synthese der membrangebundenen Fusionsproteine LacYH1-Sak und LacYH1-3-Sak und erläutert schematisch das Prinzip des Surface-Displays mit *E. coli* LWF+WEI. a: Western blot-Analyse mit Sak-spezifischer Immunofärbung; lane 1, Molekulargewichtstandard; lane 2, Sak-Standard; lane 3, Membranfraktion von LacYH1-Sak exprimierenden Zellen; lane 4, Membranfraktion von LacYH1-3-Sak exprimierenden Zellen. b: Prinzip der

- 53 -

Verankerung der Fusionsproteine im Phospholipidbilayer der Membran; 5, Staphylokinaseanteil; 6 , Laktose-Permeaseanteil (transmembrane Helices im Phospholipid-Bilayer).

1. Mit den angewandten Verfahren können die Gensequenzen der integralen Membrananker-Domänen (Helix 1 und Helices 1-3) von der Laktose-Permease LacY, von der Preprotein-Translokase SecY aus *E. coli* und von dem Schwärmprotein CcmA (Helix 1) aus *P. mirabilis* (Abb. 7) so mit dem Staphylokinasegen fusioniert werden, daß sie sich in das Plasmid pF003-Kan integrieren lassen (Abb. 8).

2. Die neuartigen Membrananker-Staphylokinase-Genkonstrukte LacYH1-Sak, LacYH1-3-Sak, SecYH1-Sak, SecYH1-3-Sak und CcmAH1-Sak werden durch IPTG-Induktion kontrollierbar in den Stämmen *E. coli* LWF+WEI und *P. mirabilis* LVIWEI überexprimiert, ohne daß das Zellwachstum gehemmt wird und die Zellen geschädigt oder lysiert werden.

3. Die Genprodukte der Membrananker-Staphylokinase-Fusionsproteine werden in solchen Mengen von den L-Form-Transformanten gebildet, daß sie im SDS-Gel und Western blot als spezifisch gefärbte Banden dargestellt werden. In Abb. 9a ist stellvertretend für alle Fusionsproteine die erfolgreiche Expression der Fusionsproteine LacYH1-Sak und LacYH1-3-Sak in *E. coli* LWF+WEI mittels Western blot-Analyse mit Sak-spezifischen Antikörpern dargestellt. Die Banden entsprechen den jeweiligen zu erwartenden Molekulargewichten (LacYH1-Sak = 20,8 kDa, LacYH1-3-Sak = 27,9 kDa). Ungefähr 5 – 50 mg/l Fusionsprodukt wurden gebildet. Abb. 9b veranschaulicht das Prinzip der Membrananker und der Fusionsproteine. Die Expression der Fusionsproteine SecYH1-Sak (23,7 kDa) und SecYH1-3-Sak (32,1 kDa) konnte in *E. coli* LWF+WEI mit den gleichen Methoden nachgewiesen werden. SecYH1-3-Sak wird allerdings nur in geringen Mengen exprimiert. *P. mirabilis* LVIWEI ist weniger gut für die Expression von Fusionsproteinen mit heterologen Membranankern von *E. coli* geeignet. Die Expression

- 54 -

des Fusionsprodukts CcmAH1-Sak in *P. mirabilis* LVIWEI verließ hingegen sehr erfolgreich. Die Menge membrangebundener Staphylokinase lag im Bereich von 100 mg/l.

4. Die Genprodukte sind überwiegend oder ausschließlich in den Membranfraktionen lokalisiert. Nur geringe Mengen können im Zytosplasma oder im Mediumüberstand gefunden werden. Im Falle der Fusionsproteine mit einer Helix (H1) ist die synthetisierte Menge an Staphylokinase wesentlich höher (3 - 10 mal) als bei den Konstruktionen mit 3 Helices (H1-3). Sie bleibt fast vollständig an die L-Form-Membran gebunden. Die mit drei Helices fusionierte Staphylokinase ist ausschließlich in membrangebundener Form nachweisbar.

5. Die in den Membranfraktionen lokalisierte Staphylokinase ist funktionell aktiv. Mit dem Milchagar-Test wurde aktive Staphylokinase nachgewiesen.

6. Die Staphylokinasemoleküle befinden sich auf der Außenseite der L-Form-Membran. Neben der positiven funktionellen Aktivität wurde dies durch den Verlust der Staphylokinase nach proteolytischem Abbau mit Trypsin, durch Rekonstitutionsexperimente in Triton X100 und Octylglycosid sowie durch Immunogoldfärbung und anschließender Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Aus den mechanischen und chemischen Behandlungen der Membranen (Scherkräfte bei Kultivierung, Waschen mit TRIS/HCl-Puffer, Präparation und Waschungen der Membran) kann geschlossen werden, daß die Staphylokinase-Moleküle sehr fest an der L-Form-Membran gebunden bleiben.

Die Ergebnisse belegen die Entwicklung neuartiger Surface-Display-Systeme, mit denen membrangebundene und Fusionsproteine aus Membrananker-Peptiden und löslichen Proteinen kontrolliert synthetisiert und in relativ großen Mengen in L-Form-Membranvesikel hergestellt werden können. Im Vergleich zu den bisherigen bekannten bakteriellen Surface-Display-Systemen liegen die

- 55 -

Vorteile dieses Systems darin, daß L-Form-Membranen relativ einfach in reiner Form gewinnbar sind, daß darin immunreaktive Komponenten (z.B. LPS, Muramylpeptide, Fimbrien, Geißeln) weitestgehend fehlen, daß extrazelluläre Proteasen fehlen, daß für das Surface-Display nur die Translokation durch die Zytosmamembran notwendig ist, daß relativ große Mengen des Fusionsproteins an der Außenseite der L-Form-Membran exponiert wird und daß das Proteinprodukt als funktionell aktive Moleküle auf der Membran gebunden bleiben.

Damit eröffnen sich mit dem L-Form-Surface-Display-System neue Wege zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen und Zell-Zell-Interaktionen sowie zur Entwicklung neuer und alternativer Vaccinierungsstrategien und diagnostischer Testsysteme.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: L170WEI	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 13361
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2000-03-06 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: Anschrift:	<p>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p> <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>Deymer u. R.</i></p> <p>Datum: 2000-03-10</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Anschrift: Beutenbergstr. 11 07708 Jena		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 13361 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2000-03-06
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG		
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2000-03-06 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus		
<input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig		
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST³		
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE		
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2000-03-10

- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
- ² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
- ³ Zutreffendes ankreuzen.
- ⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

INTERNATIONAL FORM

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: LWF+WEI	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 13362
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2000-03-06 (Date of the original deposit)¹.</p>	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2000-03-10</p>

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

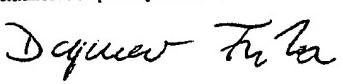
INTERNATIONAL FORM

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Address: Beutenbergstr. 11 07708 Jena		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 13362 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2000-03-06
III. VIABILITY STATEMENT		
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2000-03-06 ² . On that date, the said microorganism was		
<input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ⁴ no longer viable		
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴		
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY		
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2000-03-10

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

INTERNATIONAL FORM

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: LVIWEI	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 13363
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2000-03-06 (Date of the original deposit).</p>	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2000-03-10</p>

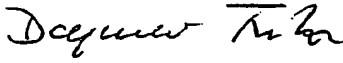
¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

INTERNATIONAL FORM

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Address: Beutenbergstr. 11 07708 Jena		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 13363 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2000-03-06
III. VIABILITY STATEMENT		
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2000-03-06 ² . On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ⁴ no longer viable		
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴		
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY		
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2000-03-10

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- ² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- ³ Mark with a cross the applicable box.
- ⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

INTERNATIONAL FORM

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: L99WEI	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 13364
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2000-03-06 (Date of the original deposit)¹.</p>	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2000-03-10</p>

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

INTERNATIONAL FORM

Institut für Molekulare
Biotechnologie e.V.
Beutenbergstr. 11

07708 Jena

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Address: Beutenbergstr. 11 07708 Jena		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 13364 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2000-03-06
III. VIABILITY STATEMENT		
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2000-03-06 ² . On that date, the said microorganism was		
<input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ⁴ no longer viable		
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴		
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY		
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2000-03-10

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von modifizierten L-Form-Bakterienstämmen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) man einen an ein komplexes Nährmedium adaptierten L-Form-Bakterienstamm alternierend bei unterschiedlichen Temperaturen im Temperaturbereich von 20 bis 40 °C kultiviert, und
 - b) bei ansteigender hydromechanischer Belastung der Zellen fermentiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt (a) und (b) eingesetzte L-Form-Bakterienstamm eine stabile Protoplasten-Typ L-Form ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der L-Form-Bakterienstamm eine L-Form von *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Nocardia asteroides*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces hygroscopicus* oder *Thermoactinomyces vulgaris* ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der L-Form-Bakterienstamm eine L-Formen von *P. mirabilis LVI*, *P. mirabilis L99*, *E. coli LWF+*, *E. coli LWF-* oder *Bac. subtilis L170* ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schritte (a) und (b) in dieser Reihenfolge durchführt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man den Schritt (a) in der Weise durchführt, daß man die Temperatur alternierend zwischen zwei Temperatu-

- ren T₁ und T₂ variiert, wobei T₁ im Verlauf des Schrittes
(a) gleich bleibt und T₂ variiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man den Schritt (b) in der Weise durchführt, daß man die Rührgeschwindigkeit variiert mit der das Fermentationsmedium gerührt wird.
 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß in den Schritten (a) und (b) das Nährmedium aus Brain-heart-infusion-broth (BHIB), Todd-Hewitt-broth (THEB), Tryptic-Soy-broth (TSOYB) und L-broth (LB) ausgewählt ist.
 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Belüftungsrate von 0,2 bis 1 Volumen Luft/Minute/Volumen Medium variiert wird.
 10. Verfahren zur Gewinnung von modifizierten L-Form-Bakterienstämmen, dadurch gekennzeichnet, daß man einen an ein komplexes Nährmedium adaptierten L-Form-Bakterienstamm durch Mutationen in den Genen *recA*, *hsdR/S*, *relA*, *supE* und/oder durch Einführung von amber- und ochre-Mutanten Rekombination, Modifikation und Restriktion und/oder durch Insertion von Genen der Transkriptions- und Translationskontrolle, wie *lacJ^q* und *lacUV-T7*, in das Chromosom modifiziert.
 11. L-Form-Bakterienstamm, erhältlich durch ein Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10.
 12. L-Form-Bakterienstamm nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er aus der aus *P. mirabilis* LVIWEI (Hinterlegungsnummer DSM 13363); *P. mirabilis* L99WEI (Hinterlegungsnummer DSM 13364), *E. coli* LWF+WEI (Hinterlegungsnummer DSM 13362) und *B. subtilis* L170WEI (Hinterlegungsnummer DSM 13361) bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

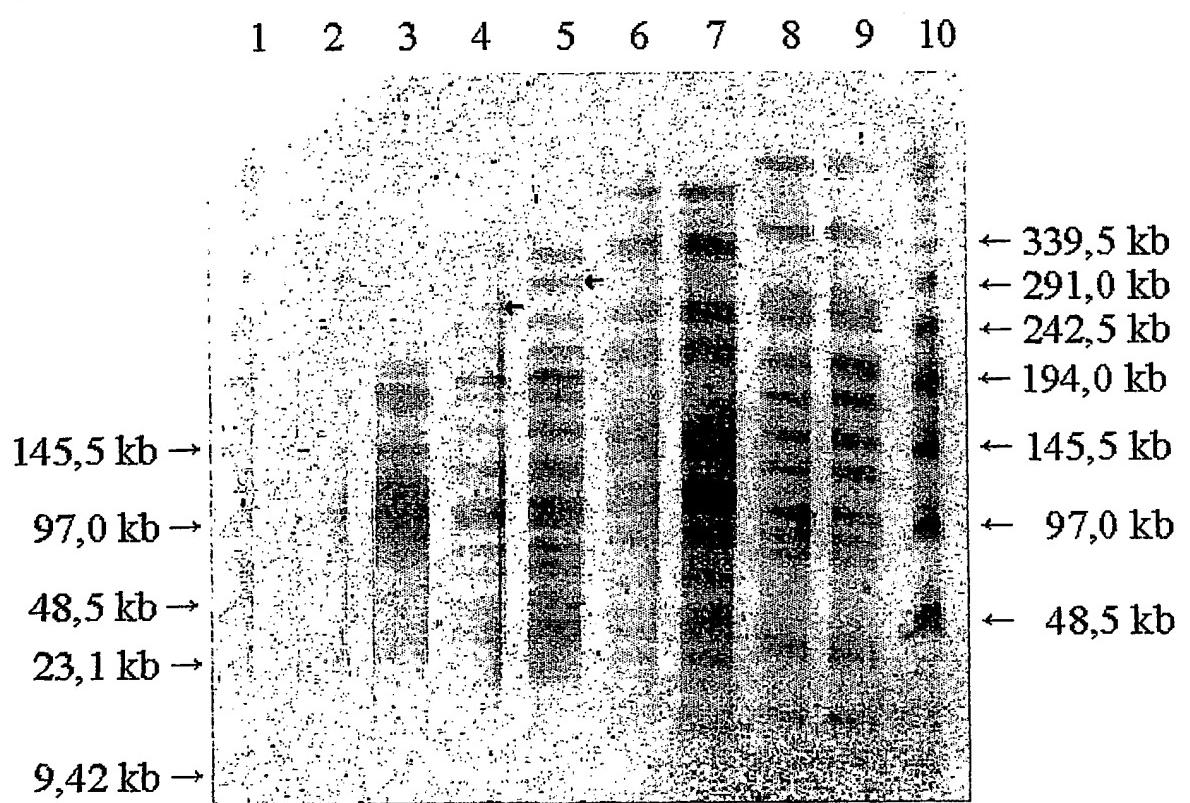
13. Verfahren zur Herstellung von Genprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß man einen L-Form-Bakterienstamm gemäß einem der Ansprüche 11 bis 12 mit einer für ein Genprodukt kodierenden Nukleotidsequenz transformiert, man dann den transformierten L-Form-Bakterienstamm kultiviert und zur Expression des Genprodukts anregt und man schließlich das Genprodukt isoliert.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Transformation ein Vektorsystem verwendet, das die für das Genprodukt kodierende Nukleotidsequenzen verknüpft mit Regulationssequenzen enthält.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt ein membrangebundenes Protein ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Produktgen mit einer zusätzlichen Gensequenz verknüpft ist, die für einen Signalpeptid, eine Sequenz einer transmembranen Region von Membranproteinen oder eine hydrophoben Aminosäuresequenz kodiert.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die zusätzliche Gensequenz für ein Signalpeptid, das nicht durch prokaryotische Signalpeptidasen vom Produktprotein abgespalten wird, für eine Transmembranhelix von integralen Membranproteinen, für eine homologe oder heterologe transmembrane Region prokaryotischer Membranproteine, für das eukaryotische Signalpeptid des SERP-Proteins oder eine hydrophobe Aminosäuresequenz mit 8 bis 150 Aminosäuren kodiert.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt ein als Arzneimittel oder Diagnostikum verwendbares Protein, eine Immundeterminante, ein Enzyminhibitor, ein Enzymaktivator, ein Rezeptor, ein

Precursor-Protein oder ein Enzym oder ein Protein der Signalübertragung ist.

19. Verfahren zur Herstellung von an Zelloberflächen gebundenem Protein, dadurch gekennzeichnet, daß man einen L-Form-Bakterienstamm mit einer Nukleotidsequenz transformiert, die für ein Genprodukt und ein damit verbundenes Signalpeptid, eine damit verbundene Sequenz einer transmembrane Region von Membranproteinen oder eine damit verbundene hydrophobe Aminosäuresequenz kodiert, man dann den transformierten L-Form-Bakterienstamm kultiviert und zur Expression des Genprodukts anregt und man schließlich das Genprodukt in an die Zellen des L-Form-Stamms gebundener Form isoliert.
20. Verfahren zur Herstellung von outer-membrane-protein (Omp) von Gram-negativen Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß man einen L-Form-Bakterienstamm mit einer Nukleotidsequenz transformiert, die für ein Omp und ein damit verbundenes Signalpeptid, eine damit verbundene Sequenz einer transmembrane Region von Membranproteinen oder eine damit verbundene hydrophobe Aminosäuresequenz kodiert, man dann den transformierten L-Form-Bakterienstamm kultiviert und zur Expression des Genprodukts anregt und man schließlich das Genprodukt isoliert.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Omp ein Omp mit β -Faltblattstruktur ist.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid ein Signalpeptid zur Translokation ist.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt eine antigenen Determinanten von pathogenen Organismen, ein single chain Antikörper oder Antikörperfragment, ein heterologes Enzym, ein Polyhistidyl Tag oder eine Peptidbibliothek ist.

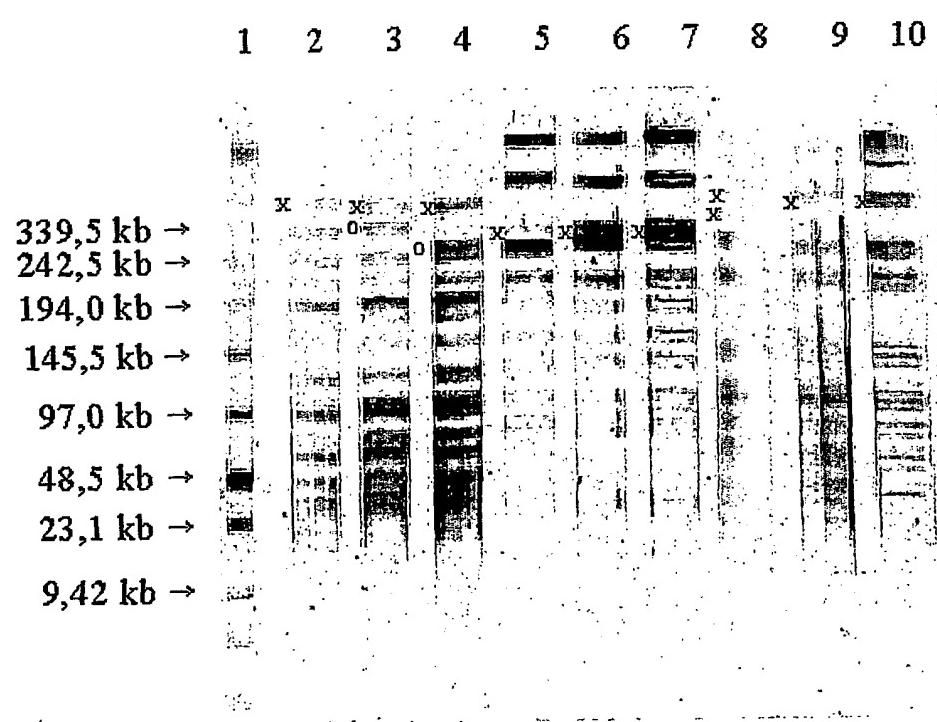
24. L-Form-Bakterienstamm, dadurch gekennzeichnet, daß er rekombinante Proteine aufweist, die über ein Signalpeptid, eine Sequenz einer transmembranen Region von Membranproteinen oder eine hydrophobe Aminosäuresequenz an der Zytosplasmamembran der L-Form-Zellen verankert sind.
25. L-Form-Bakterienstamm nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein eine antigene Determinante von pathogenen Organismen, ein single chain Antikörper oder Antikörperfragment, ein heterologes Enzym, ein Polyhistidyl Tag oder eine Peptidbibliothek ist.
26. L-Form-Bakterienstamm, dadurch gekennzeichnet, daß er rekombinante Proteine aufweist, die Omps mit β -Faltblattstruktur sind.
27. Impfstoff enthaltend einen L-Form-Bakterienstamm gemäß einem der Ansprüche 24 bis 25.
28. Verwendung eines L-Form-Bakterienstamms nach einem der Ansprüche 24 bis 26 zur Expression von Proteinen, als Impfstoff, zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik und Therapie, als Biokatalysator oder für Interaktionsscreenings.
29. Verwendung eines L-Form-Bakterienstamms nach einem der Ansprüchen 10 bis 11 zur Expression von Proteinen.

Abb. 1.



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Abb. 2.



ERSATZBLATT (REGEL 26)

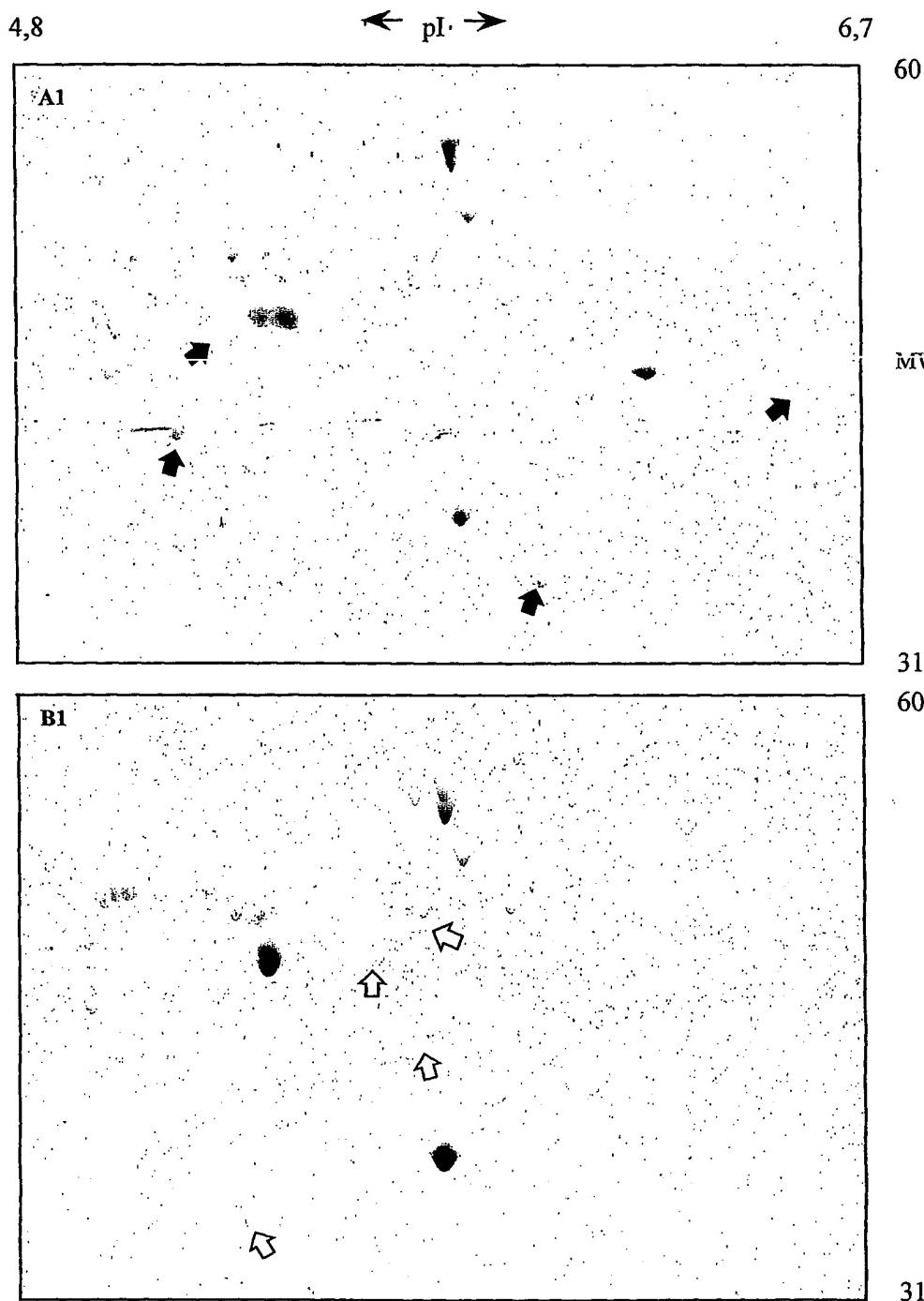


ABB. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

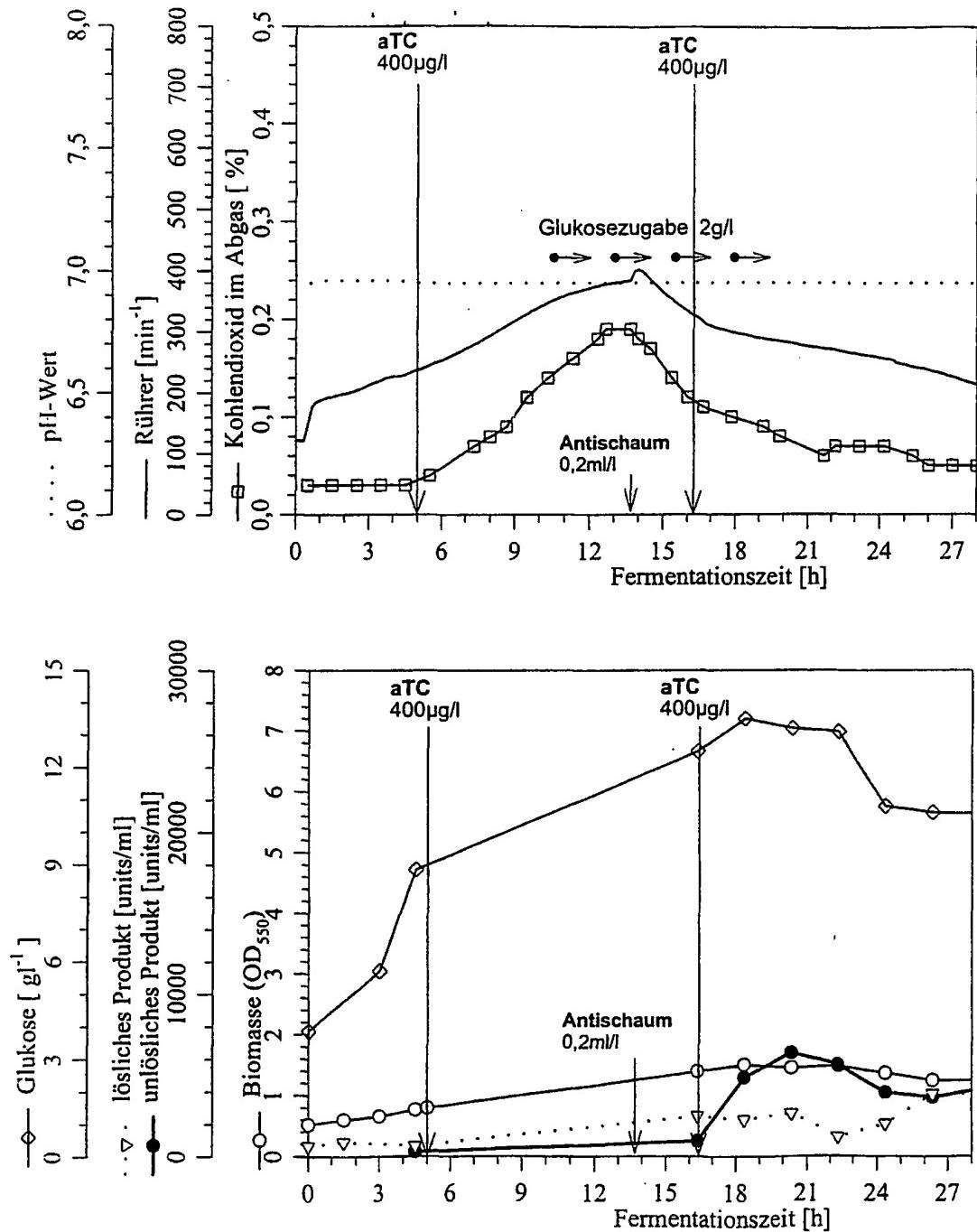
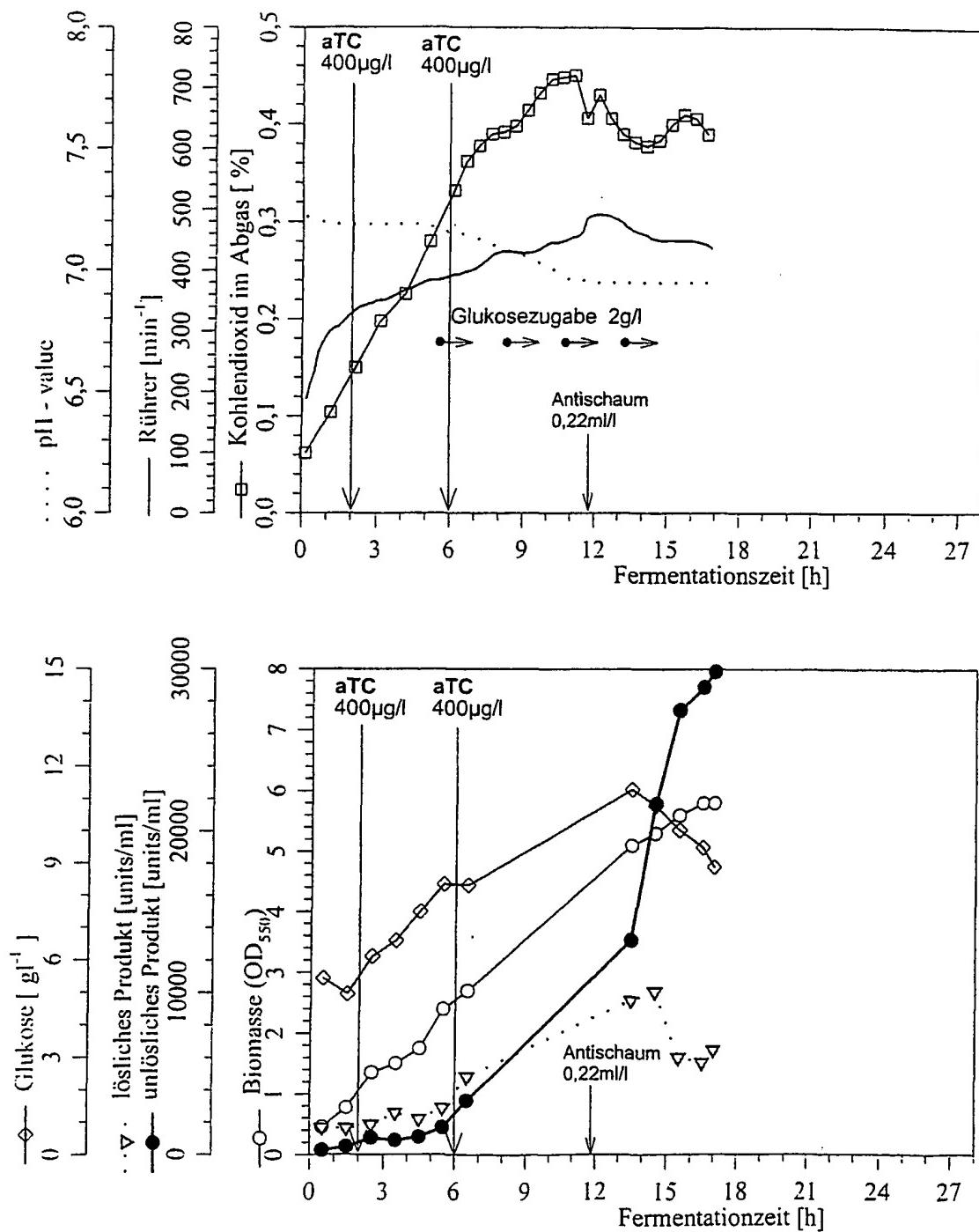
Abb. 4a: *P. mirabilis* LVI (p6H-42-3D7)

Abb. 4b: *P. mirabilis* LVIWEI (p6H-42-3D7)

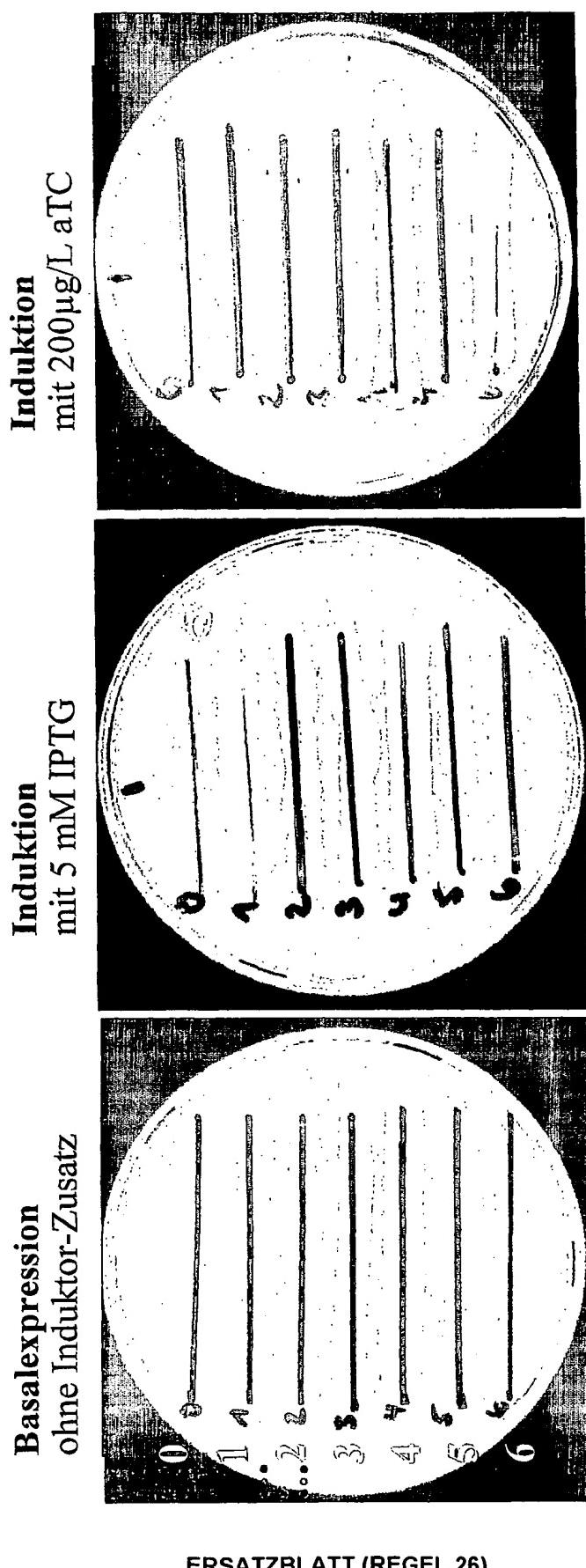


Abb. 5: Induzierbarkeit der GFP-Synthese in *P. mirabilis* LVIWEI mit verschiedenen Promoter-Gen-Konstrukten

ERSATZBLATT (REGEL 26)

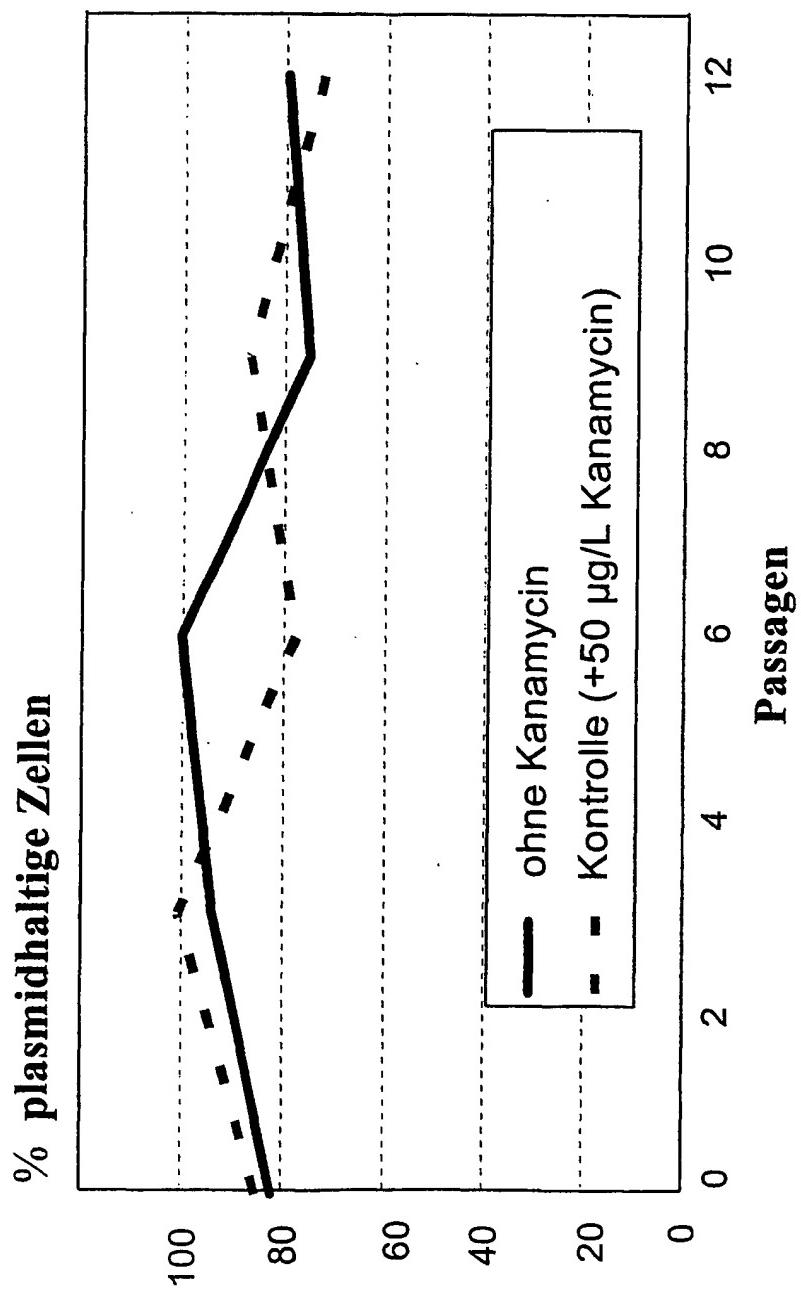


Abb. 6: Segnegative und strukturelle Stabilität des Plasmids pMK3c2GFP in *P. mirabilis* LVIWEI.

Abb. 7**a) LacYH1-Sak**

MYYLKNTNFWMFGLFFFFYFFIMGAYFPFFPIWLHDINHISLQSSFDKGKYKKGDDASYFE
PTGPYLMVNVTGVDGKRNELLSPRYVEFPIKPGTTLTKEKIEYYVEWALDATAKFRVVEL
DPSAKIEVTYYDKNKKKEETKSFPITEKGFVVVPDLSEHKNPGFNLTKVVIEKK

ATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTGGATGTTGGTTATTCTTTCTTTACTTTT
TATCATGGGAGCCTACTTCCGTTTTCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATAATCAG
CCTGCAGTCAGTTCAAGTCATTGACAAGGAAAATAAAAAAGGCGATGACGCGAGTTATT
TTGAACCAACAGGCCGTATTGATGGTAATGTGACTGGAGTTGATGGAAAAGAAAAT
GAATTGCTATCCCCTCGTTATGTCGAGTTCTATTAAACCTGGGACTACACTACAAAAA
GAAAAAAATTGAATACTATGTCGAATGGCATTAGATGCGACAGCATATAAAGAGTTAGA
GTAGTTGAATTAGATCCAAGCGCAAAGATCGAAGTCACTTATTATGATAAGAATAAGAAA
AAAGAAGAACGAAGTCTTCCCTATAACAGAAAAAGGTTTGTGTCAGATTATCA
GAGCATATTAAAAACCTGGATTCAACTTAATTACAAAGGTTTATAGAAAAGAAATAA

b) LacYH1-3-Sak

MYYLKNTNFWMFGLFFFFYFFIMGAYFPFFPIWLHDINHISKSDTGIIFAAISLSLLFQPLFGL
LSDKLGLRKYLLWIITGMLVMFAPFFIEGPLLQYLQSSSF.....IEKK

ATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTGGATGTTGGTTATTCTTTCTTTACTTTT
TATCATGGGAGCCTACTTCCGTTTTCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATAATCAG
CAAAGTGATACGGGTATTATTTTGCCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATCCAACCG
CTGTTGGTCTGCTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTAC
CGGCATGTTAGTGATGTTGCGCCGTTCTTATTTTATCTCGGGCCACTGTTACAATA
CCTGCAGTCAGTTCAAGTCATT.....GAAAAGAAATAA

c) SecYH1-Sak

MAKQPGLDFOSAKGGLGELKRRLLFVIGALIVFRIGSFIPIPGIDA AVLAKLLEQQRGTIEMEN
MFSGGALSRLQSSSF....IEKK

ATGGCTAAACAACCGGGATTAGATTTCAAAGTCCAAAGGTGGCTTAGGCGAGCTGAA
ACGCAGACTGCTGTTGTTATCGGTGCGCTGATTGTGTTCCGTATTGGCTCTTTATTCC
GATCCCTGGTATTGATGCCGCTGTACTTGCCAAACTGCTTGAGCAACAGCGAGGCACCA
TCATTGAGATGTTAACATGTTCTCTGGTGGTGCTCTCAGCCGTCTGCAGTCAGTCAAGTTCAT
TC.....GAAAAGAAATAA

d) SecYH1-3-Sak

MAKQPGLDFOSAKGGLGELKRRLLFVIGALIVFRIGSFIPIPGIDA AVLAKLLEQQRGTIEMEN
MFSGGALSRSRASIFALGIMPYISASIIQLTVVHPTLAEIKKEGESGRRKISQYTRYGTLVLAIFQ
SIGIATGLPNMPGMQGLVINPGLQSSSF....IEKK

ATGGCTAAACAACCGGGATTAGATTTCAAAGTCCAAAGGTGGCTTAGGCGAGCTGAA
ACGCAGACTGCTGTTGTTATCGGTGCGCTGATTGTGTTCCGTATTGGCTCTTTATTCC
GATCCCTGGTATTGATGCCGCTGTACTTGCCAAACTGCTTGAGCAACAGCGAGGCACCA
TCATTGAGATGTTAACATGTTCTCTGGTGGTGCTCTCAGCCGTGCTTCTATCTTGCTC
TGGGGATCATGCCGTATATTCCGGCGTCGATCATTATCCAGCTGCTGACGGTGGTTCAC
CCAACGTTGGCAGAAATTAAAGAAAGAAGGGGAGTCTGGTCGTCGAAGATCAGCCAGT
ACACCCGCTACGGTACTCTGGTGCTGGCAATATTCCAGTCGATCGGTATTGCTACCGGT

CTGCCGAATATGCCTGGTATGCAAGGCCTGGTATTAAACCCGGGCCTGCAGTCAAGTT

CATTC GAAAAGAAATAA

e) CcmAH1-Sak

MDNKRTQRDIIFSIWIIWSCALMAFWRYQIAGESTTRELQSSSF.....IEKK

ATGGATAATAAGCGAACACAGCGGGATATTATATTAGCATAATATGGATTATTTGGTCA

TGTGCATTAATGGCTTTGGCGATATCAAATAGCTGGTGAGAGCACCAACCAGAGAAACT

GCAGTCAAGTTCATTC.....GAAAAGAAATAA

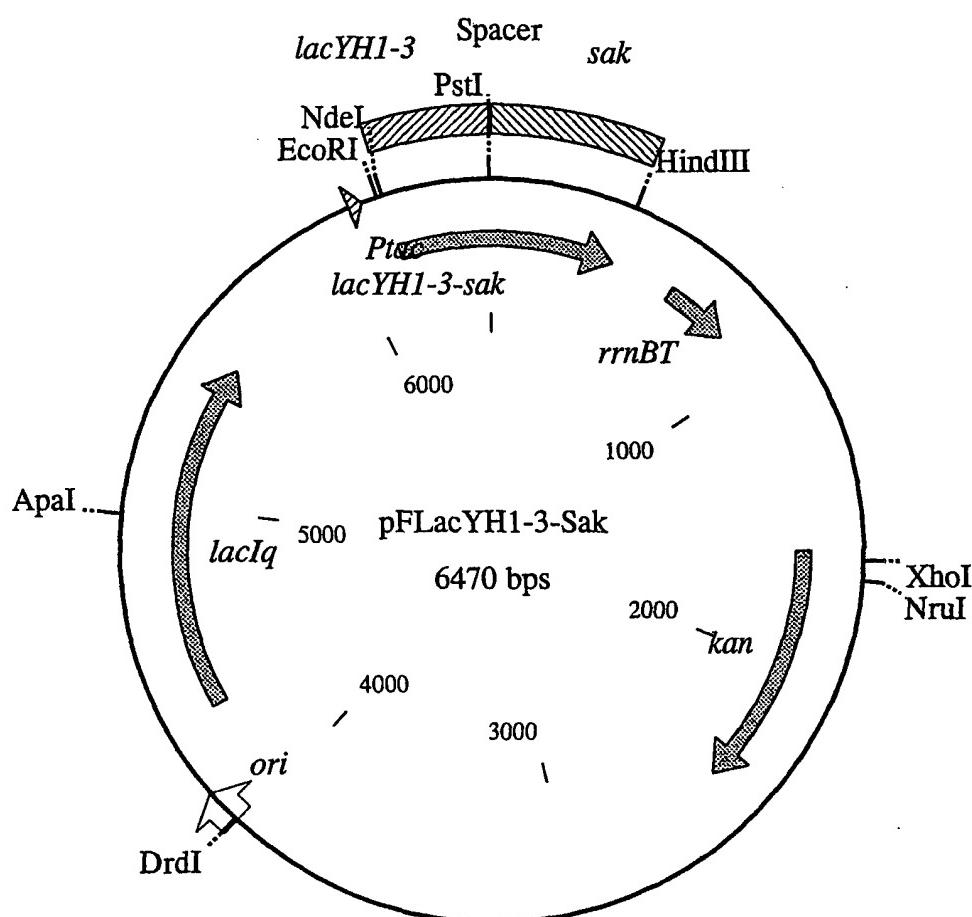
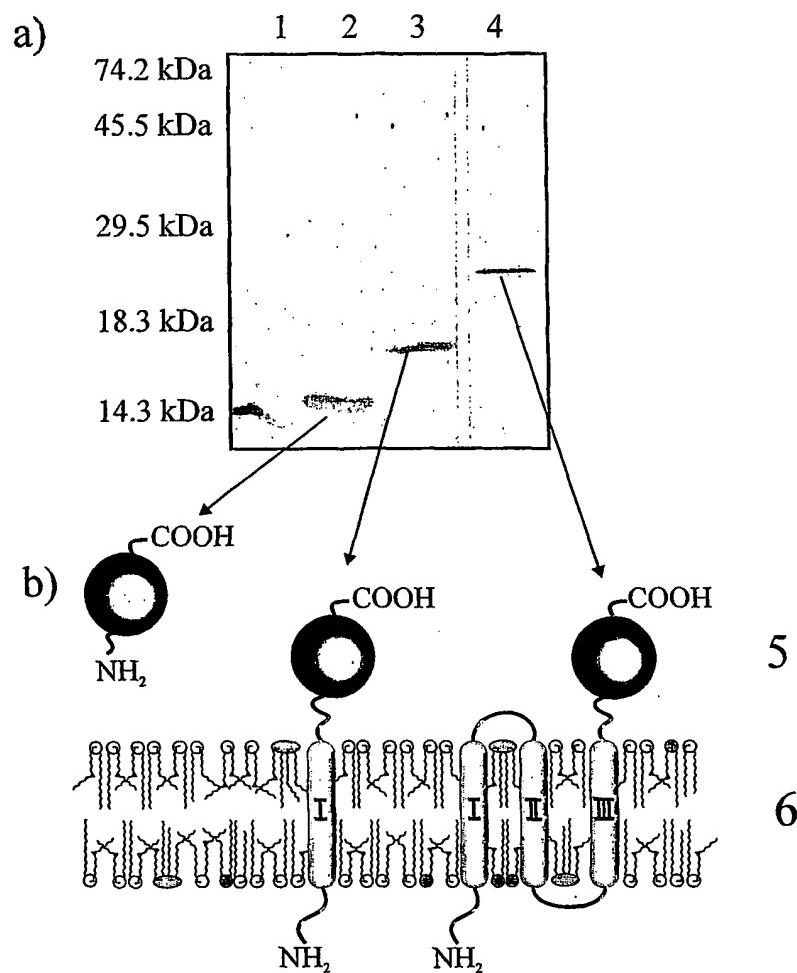
Abb. 8

Abb. 9



ERSATZBLATT (REGEL 26)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. September 2001 (13.09.2001)

PCT

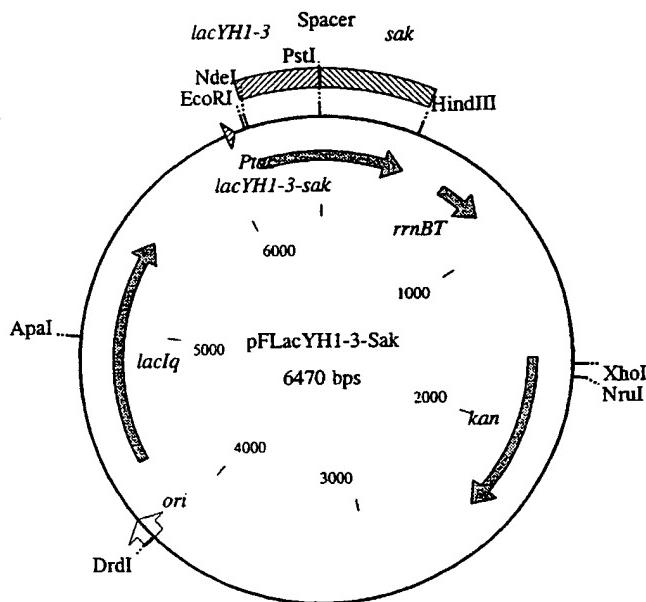
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/66776 A3

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	C12N 15/70. 15/74, 15/30, 15/31, 15/62, 1/20, C12P 21/00, 21/02, C12R 1/125, 1/19, 1/37, C07K 14/31, 14/445, A61K 39/015, 39/085 // (C12P 21/00, C12R 1:125) (C12P 21/00, C12R 1:19) (C12P 21/00, C12R 1:37) (C12P 21/02, C12R 1:125) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:37)	100 11 358.3	12. März 2000 (12.03.2000)	DE
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP01/02630	(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE E.V. [DE/DE]: Beutenbergstrasse 11, 07745 Jena (DE).		
(22) Internationales Anmeldedatum:	8. März 2001 (08.03.2001)	(72) Erfinder; und		
(25) Einreichungssprache:	Deutsch	(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOISCHEN, Christian [DE/DE]: Berthold-Delbrück-Str. 58, 07749 Jena (DE). GUMPERT, Johannes [DE/DE]: Fritz-Ritter-Str. 20, 07747 Jena (DE). KUJAU, Joachim, Marian [DE/DE]: Anna Siemsen Str. 55, 07745 Jena (DE). FRITSCHE, Christine [DE/DE]: Dornburger Str. 130, 07743 Jena (DE). ELSKE, Gerda [DE/DE]: Überm Anger 6, 07751 Isserstedt (DE). FAHNERT, Beatrix [DE/DE]: Lasurstr. 15, 07551 Gera (DE). SIEBEN, Stefan [DE/DE]: Pfälzer Str. 22, 06106 Halle/Saale (DE).		
(26) Veröffentlichungssprache:	Deutsch			
(30) Angaben zur Priorität:	100 11 617.5 10. März 2000 (10.03.2000) DE			

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL L-FORM BACTERIAL STRAINS, METHOD FOR PRODUCING SAME AND THE USE THEREOF FOR PRODUCING GENE PRODUCTS

(54) Bezeichnung: NEUARTIGE L-FORM-BAKTERIENSTÄMME, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG SOWIE DEREN VERWENDUNG ZUR HERSTELLUNG VON GENPRODUKTEN



WO 01/66776 A3

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining modified L-form bacterial strains. According to the inventive method, (a) an L-form bacterial strain that is adapted to a complex culture medium is alternately cultivated at different temperatures ranging from 20 to 40 °C and (b) is fermented when the hydromechanical stress of the cells increases. The invention also relates to modified L-form bacterial strains which can be obtained according to the inventive method and to the use thereof for producing gene products.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



MÜLLER, Hans, Peter [DE/DE]: Gliesshamm 4B, 27607 Langen (DE).

(74) Anwälte: MUTH, Heinz-Peter usw.: Uexküll & Stolberg, Beselerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),

eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

30. Mai 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Gewinnung von modifizierten L-Form-Bakterienstämmen bei dem man (a) einen an ein komplexes Nährmedium adaptierten L-Form-Bakterienstamm alternierend bei unterschiedlichen Temperaturen im Temperaturbereich von 20 bis 40 °C kultiviert und (b) bei ansteigender hydromechanischer Belastung der Zellen fermentiert, modifizierte L-Form-Bakterienstämmen, die gemäss dem Verfahren erhältlich sind, und deren Verwendung zur Herstellung von Genprodukten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/02630

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C12N15/70	C12N15/74	C12N15/30	C12N15/31	C12N15/62
	C12N1/20	C12P21/00	C12P21/02	C12R1/125	C12R1/19
	C12R1/37	C07K14/31	C07K14/445	A61K39/015	A61K39/085

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12R C12P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GUMPERT J ET AL.: "Use of cell wall-less bacteria (L-forms) for efficient expression and secretion of heterologous gene products" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 9, no. 5, October 1998 (1998-10), pages 506-509, XP001012424 ISSN: 0958-1669 cited in the application the whole document ---	19, 20, 22-25, 28
Y	-/-	27

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

7 January 2002

24/01/2002

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van de Kamp, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna
nal Application No
PCT/EP 01/02630

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 //((C12P21/00,C12R1:125),(C12P21/00,C12R1:19),(C12P21/00,C12R1:37),(C12P21/02,C12R1:125),(C12P21/02,C12R1:19),(C12P21/02,C12R1:37))

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>STAHL S ET AL.: "Bacterial surface display: trends and progress" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 15, no. 5, 1 May 1997 (1997-05-01), pages 185-192, XP004059848 ISSN: 0167-7799 cited in the application abstract page 188, right-hand column, line 12 -page 189, right-hand column, line 15 --- -/-</p>	27

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

7 January 2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van de Kamp, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr	nal Application No
PCT/EP 01/02630	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIEBEN S ET AL.: "The <i>Serratia marcescens</i> hemolysin is secreted but not activated by stable protoplast-type L-forms of <i>Proteus mirabilis</i> " ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, vol. 170, no. 4, October 1998 (1998-10), pages 236-242, XP001034299 abstract ---	19-26, 28
X	DD 269 166 A (ADW DDR) 21 June 1989 (1989-06-21) cited in the application the whole document ---	19, 20, 22-25, 28
A	KÖNNINGER U W ET AL.: "The haemolysin-secreting Sh1B protein of the outer membrane of <i>Serratia marcescens</i> : Determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by Sh1B mutants in artificial lipid bilayer membranes." MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 1212-1225, XP002182856 ISSN: 0950-382X page 1216, left-hand column, line 5 -page 1217, left-hand column, line 33 figure 3 page 1220, right-hand column, line 8 -page 1221, right-hand column, line 48 ---	21, 26
A	WO 98 14583 A (PAN WEIQUING ;BUJARD HERMANN (DE); TOLLE RALF (DE)) 9 April 1998 (1998-04-09) the whole document ---	
A	GUMPERT J ET AL.: "Characteristic properties and biological significance of stable protoplast type L-forms" EXPERIENTIA SUPPLEMENTUM, vol. 46, 12 August 1983 (1983-08-12), pages 227-241, XP001012425 ISSN: 0071-335X cited in the application ---	
A	SAMBROOK J ET AL.: "Molecular Cloning (Laboratory Manual) Appendix A. Bacterial Strains" 1990 , COLD SPRING HARBOR PRESS , COLD SPRING HARBOR LABORATORIES, US XP002182858 table A.2 ---	10
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/02630

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEMAIN A L ET AL.: "Manual of industrial microbiology and biotechnology, 2nd ed" 1999 , ASM PRESS , AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, 1325 MASSACHUSETTS AVENUE, N.W., WASHINGTON, DC 20005-4171 XP002182859 VINCI A V ET AL.: "Strain improvement by nonrecombinant methods" page 103-113 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/02630

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
DD 269166	A	21-06-1989	DD DD	269166 A1 269166 B5	21-06-1989 16-06-1994
WO 9814583	A	09-04-1998	DE AU AU CN WO EP JP	19640817 A1 727864 B2 4864997 A 1236391 A 9814583 A2 0929677 A2 2000516477 T	14-05-1998 04-01-2001 24-04-1998 24-11-1999 09-04-1998 21-07-1999 12-12-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/02630

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 7	C12N15/70	C12N15/74	C12N15/30	C12N15/31	C12N15/62
	C12N1/20	C12P21/00	C12P21/02	C12R1/125	C12R1/19
	C12R1/37	C07K14/31	C07K14/445	A61K39/015	A61K39/085

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C12R C12P A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GUMPERT J ET AL.: "Use of cell wall-less bacteria (L-forms) for efficient expression and secretion of heterologous gene products" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 9, Nr. 5, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 506-509, XP001012424 ISSN: 0958-1669 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	19, 20, 22-25, 28
Y	---	27 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *g* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

7. Januar 2002

24/01/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van de Kamp, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/02630

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 // (C12P21/00, C12R1:125), (C12P21/00, C12R1:19), (C12P21/00, C12R1:37), (C12P21/02, C12R1:125), (C12P21/02, C12R1:19), (C12P21/02, C12R1:37)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>STAHL S ET AL.: "Bacterial surface display: trends and progress" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 15, Nr. 5, 1. Mai 1997 (1997-05-01), Seiten 185-192, XP004059848 ISSN: 0167-7799 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 188, rechte Spalte, Zeile 12 -Seite 189, rechte Spalte, Zeile 15</p> <p style="text-align: center;">—/—</p>	27



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

7. Januar 2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van de Kamp, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/02630

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SIEBEN S ET AL.: "The <i>Serratia marcescens</i> hemolysin is secreted but not activated by stable protoplast-type L-forms of <i>Proteus mirabilis</i> " ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, Bd. 170, Nr. 4, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 236-242, XP001034299 Zusammenfassung ---	19-26, 28
X	DD 269 166 A (ADW DDR) 21. Juni 1989 (1989-06-21) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	19, 20, 22-25, 28
A	KÖNNINGER U W ET AL.: "The haemolysin-secreting Sh1B protein of the outer membrane of <i>Serratia marcescens</i> : Determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by Sh1B mutants in artificial lipid bilayer membranes." MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 32, Nr. 6, Juni 1999 (1999-06), Seiten 1212-1225, XP002182856 ISSN: 0950-382X Seite 1216, linke Spalte, Zeile 5 -Seite 1217, linke Spalte, Zeile 33 Abbildung 3 Seite 1220, rechte Spalte, Zeile 8 -Seite 1221, rechte Spalte, Zeile 48 ---	21, 26
A	WO 98 14583 A (PAN WEIQING ;BUJARD HERMANN (DE); TOLLE RALF (DE)) 9. April 1998 (1998-04-09) das ganze Dokument ---	
A	GUMPERT J ET AL.: "Characteristic properties and biological significance of stable protoplast type L-forms" EXPERIENTIA SUPPLEMENTUM, Bd. 46, 12. August 1983 (1983-08-12), Seiten 227-241, XP001012425 ISSN: 0071-335X in der Anmeldung erwähnt ---	
A	SAMBROOK J ET AL.: "Molecular Cloning (Laboratory Manual) Appendix A. Bacterial Strains" 1990 , COLD SPRING HARBOR PRESS , COLD SPRING HARBOR LABORATORIES, US XP002182858 Tabelle A.2 ---	10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 01/02630

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DEMAIN A L ET AL.: "Manual of industrial microbiology and biotechnology, 2nd ed" 1999 , ASM PRESS , AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, 1325 MASSACHUSETTS AVENUE, N.W., WASHINGTON, DC 20005-4171 XP002182859</p> <p>VINCI A V ET AL.: "Strain improvement by nonrecombinant methods"</p> <p>Seite 103-113</p> <p>-----</p>	1

3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/02630

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DD 269166	A	21-06-1989	DD 269166 A1 DD 269166 B5	21-06-1989 16-06-1994
WO 9814583	A	09-04-1998	DE 19640817 A1 AU 727864 B2 AÜ 4864997 A CN 1236391 A WO 9814583 A2 EP 0929677 A2 JP 2000516477 T	14-05-1998 04-01-2001 24-04-1998 24-11-1999 09-04-1998 21-07-1999 12-12-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.